



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

**INTERRELACIONES MOLECULARES Y FUNCIONALES  
ENTRE RECEPTORES DE DOPAMINA,  
CANNABINOIDES Y ADENOSINA EN EL ESTRIADO**

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia  
**GEMMA NAVARRO BRUGAL**  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Biomedicina del  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de  
Barcelona, bienio 2005-2007

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido  
realizados por Gemma Navarro Brugal bajo la dirección de la Dra. Carme Lluís  
Biset y el Dr. Enric I. Canela Campos

Dra. Carme Lluís Biset

Dr. Enric I. Canela Campos

Gemma Navarro Brugal

*Barcelona, Enero de 2010*



*A l'Òria,  
perque és petita i a la vegada, gran*



Quizás, utilizar el catalán como instrumento para los agradecimientos puede parecer fuera de lugar, pero realmente me veo incapaz de expresar mis sentimientos en cualquier otra lengua.

No us podeu imaginar que complicat resulta escriure aquestes ratlles, perquè significa que això s'acaba i no sé si sabré posar-hi punt i final. Igual me'n descuido. M'heu donat tant, que no tinc paraules per donar-vos les gràcies. Fer feliç una persona, pot semblar fàcil, però es molt difícil i vosaltres ho heu aconseguit cada segon de la meva vida! Considero que ho tinc tot, i això es perquè us tinc al meu costat. Sense vosaltres, no existiria.

En primer lloc donar les gràcies a l'Enric, per haver-me convençut d'embolicar-me en aquest projecte que m'ha donat tants bons moments i alegries. Crec que he trobat on col·locar la meva peça en aquest immens trencaclosques. Sempre admiraré la seva autenticitat, paciència i ganes d'ajudar, a part de tots els seus mèrits. Al Rafa, per haver-me obert les portes d'aquest grup i haver confiat en mi en tot moment. A la Pepi, la persona més eficient que he conegut mai. Mai ha dubtat ni un segon quan he necessitat la seva ajuda. Al Paco. A l'Antoni, el laboratori no seria el mateix sense ell. Sempre he pensat que als experiments se'ls ha de tractar amb carinyu, i a les persones amb alegria, i això ens ho dona ell cada dia. Al Vicent, l'home més perseguit d'aquest planeta. Sempre admiraré la seva pulcritud a l'hora de treballar. Al Sergi, un gran científic i una persona encantadora. I finalment a la Carme, no tinc paraules per expressar tot el que sento, perquè podria escriure pàgines i més pàgines i sempre que les rellegís em semblarien pobres. La seva capacitat de treball és impecable, i les reunions de resultats els millors moments d'aquesta tesi. M'ha ensenyat com pensa una ment científica, com demostra els primers indicis i com discuteix cadascun dels resultats. Ha confiat en mi en tot moment i m'ha sabut entendre en els moments més difícils. Sempre seràs especial.

Als meus companys. Dani, teves van ser les primeres paraules de benvinguda, i mai les oblidaré. Des del primer moment em va enamorar la teva forma de treballar, i em vaig enganxar a la teva bata fins aconseguir imitar-te més o menys bé. Gràcies per la teva paciència i hospitalitat. Rodrigo, mestre de mestres, m'hagués agradat coincidir més temps, per poder meravellar-me encara més. Paulina, ha estat un plaer seguir el camí que vas obrir. Laia Canela, la teva senzillesa fa que tothom es senti bé al teu costat. Gràcies per no negar-me mai un bon consell. Nuri i Tipet. Carla, "que miedo has esparcido por todas partes" però crec que no has enganyat a ningú, tothom acaba descobrint la gran persona que portes dins. Papi Harold, els teus somriures amb el cubata

entre els dits, donaran la volta al món. Edu, quanta paciència arribes a tenir. Amb tu, la mar sempre estaria en calma. No et preocupis per les fotos, en les importants, sempre surts perfecte. Chemitaaaa, no saps com t'he trobat a faltar cada matí, el teu bon humor és contagiós. Ets un company increïble, i tots, absolutament tots els que hem compartit el laboratori amb tu, sempre t'estimarem. Aroa, mai he tingut ídols, perquè penso que cada persona es especial, però si m'hagués de quedar amb un, series Tu. Posseeixes totes les virtuts que admiro en una persona, i tot i així, segueixes sent diferent. Capitanaaa, es un plaer combatre al teu costat, i espero que no te'n vagis mai, perquè et perseguiré, jajajaja. Gràcies per ser com ets i oferir-me sempre les dues mans. Seràs una gran mami.

Un dia, els grans es van fer grans i se'n van anar. I van arribar els petits, però no per ser petits van ser menys grans.

Patrizinha, mi colifloor, no es gens fàcil veure'm emocionada, i el dia que vas marxar no podia deixar de vessar llàgrimes. Sempre seràs una font de colors i alegria i amb la teva potent veu, t'escoltaré siguis on siguis. Dasiiii, només escriure el teu nom ja se'm dibuixa una rialla, que gran que ets, i això només és el principi. M'has ensenyat una altre manera de mirar el món, i és meravellosa. Saps que tots els genis parteixen d'un petit caos? A veure si algun dia podem tornar a treballar tots tres junts. Jorge, ex- predilecte i millor company de sudokus! Gràcies per tenir tanta paciència amb mi. Montse, només vam coincidir un meset, però en vam tenir prou per lligar una amistat que encara dura, i que no s'acabi mai. Gràcies a la dolça Pilar i a la Marta. Estefania, gràcies per haver-te obert a mi, he descobert una persona encantadora que m'agradaria tenir sempre al meu costat. Sempre cuidant-me i preocupant-te per mi amb detalls que et fan única i increïble i que no t'oblidi mai. Ets un tresor. Víctor, aquí tens un BON DIA dedicat exclusivament a Tu. Noble, honest i bondadós, tres adjectius que dus enganxats amb l'esparadrap que alguns utilitzarien per una altra cosa. Gràcies per tot! Laia Barceló, quina sort tindran els nens que et tinguin de professora, perquè no es pot ser millor. Que maca que ets. Invasora de l'espai, però maquíssima! T'aprecio molt. Jordi, no sé com obrir la boca sense que miris el Carles i et posis a riure. Sou genials. Vosaltres convertiu els dinars en el millor moment del dia. Ets un sol. Jasmina, Dulci, ja sé que et dec un imperi, però la meva pobresa no podrà complir mai els teus somnis. Crec que ets el millor fitxatge que ha fet aquest laboratori, curranta, eficient i amb les dents suficients per mossegar aquell que es passi de la ratlla. M'encantes. Mil gràcies per tota l'ajuda que mai m'has negat. Luci, la meva millor alumna. Sempre et preocupes per mi com fan les grans amigues. Potser jo sóc una mica

més desastre, però sempre em tindràs al teu costat. Aventurera, lluitadora i idealista, gràcies per obrir-me una altra finestra del món. T'admiro i ho faré sempre. Mile i Darco, quina pena que marxéssiu tan aviat. Mile, des del primer dia sempre m'has entès. Quantes paraules deien els teus silencis. Ets increïble. Sergio, quants anys entre aquests laboratoris. Jana, crec que abans mai ningú m'havia tingut por. Em va costar molt arrencar tots els pètals de la rosa fins descobrir un petit cor de xocolata. Ets i sempre seràs molt especial, no canviïs mai. Carles, Mr. Tweex i Mr.informàtica. Què faria jo sense vos? Sempre tens temps per aturar el que estàs fent i socórrem en els meus múltiples problemes. I de postres, una galeta de xocolata. Gràcies. Marc, waterpolista de primera. No siguis tan brutot, o ens faràs córrer a tots algun dia. Gràcies per fer-me riure cada dia i per preocupar-te de que sempre tingués una cadira. Ets una gran persona..tun tun! Jordi Farrés! El senyor barretaire! Mira que em vas donar feina, però també moltes alegries. Que tinguis moltíssima sort, que ja et toca. Isaac, o Newton, sempre de bon humor, sempre disposat a regalar un somriure, tens una xispa que et fa únic, m'encanta que compartim vaixell. Dani, no em coincidit gaire, però ja ens coneixerem. Anna, la filla adoptiva dels receptors. Sempre riallera, sempre de bon humor i dolça com un pastisset de xocolata. Sempre tindràs un lloquet entre nosaltres. Patri, gràcies per buscar-me sempre un foradet a la campana. Kamil, la postdoc del grup. No hem compartit tan temps com amb els altres, però et desitjo molta sort. I finalment el senyor Manolo, "que grande eres".

A les meves nenes, sou molt especials, perquè teniu el do d'arrencar-me un somriure sempre que em fa falta. Mira que ens ho hem arribat a passar bé! Ana, la teva personalitat és única i m'ha guiat moltes vegades. No et deixaré escapar mai del meu costat! Juan, gràcies per cuidar-nos una mica a totes, sempre em tindràs pel que et faci falta. Sempre heu estat al meu costat i m'heu intentat entendre en els moments més difícils. Gràcies a tots per fer-me la vida molt més fàcil i increïblement divertida.

A la família Díez, Enric i Mari, gràcies per haver-me obert els braços des del primer dia, per oferir-me sempre tot el que teniu, i acceptar-me tal com sóc. Nurieta, guapíssima, has estat al meu costat en els moments més difícils, m'has fet plorar amb les teves llàgrimes i emocionar amb els teus abraços. Eli, sempre he pensat que eres freda, però eres qui m'acaronava quan em sentia més sola. Admiro la teva forma d'entendre les coses. Les xerrades amb tu mai han deixat d'ensenyar-me coses. Ivan, gràcies per prestar-me el teu llitet cada cap de setmana i per cuidar sempre del Ferran com si fos de tu mateix. Miriam, perquè l'amistat que acabem de començar duri per sempre.

Als meus pares, perquè ells m'han fet qui sóc i com sóc. Sou i sempre sereu el meu exemple a seguir. A la meva mare, perquè sempre m'ha defensat davant de tots els problemes. Perquè ens ha exigit al màxim, ens ha ensenyat a valorar-nos i a treure profit de totes les nostres virtuts. Sempre ens ho has donat tot. I al meu pare, perquè m'has ensenyat a lluitar pel que crec, a ser més tolerant amb tot el que m'envolta i l'immersió en l'art de la lectura. Us estimo, i em feu sentir orgullosa cada dia. Als meus avis, ments brillants i persones encantadores. Viviteet, Crak de craks. A la pista meravelles, els que et miren t'ovacionen i els que et coneixen enamores. Ets el millor regal que em podien fer els pares. Créixer al teu costat ha estat un somni fet realitat. Part de la meva felicitat es culpa teva. T'estimo i ho faré sempre. Andreiña, la gallega de la família, "tu personalidad te hace grande y tu sonrisa contagia".

I finalment Tu, Ferran, junts vam adoptar la millor gossa del món, la Kirah! I vam fer realitat un somni, l'Òria. Gràcies per oferir-me la mà sempre que dubto en fer un pas endavant, per arrencar-me un somriure quan em poso trista, per abraçar-me i no deixar-me sentir mai sola, per convertir en felicitat cada granet del meu rellotge de sorra. Les teves paraules sempre em transmeten tranquil·litat i la teva música em té el cor robat. T'estimo.



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Receptores acoplados a proteína G</b>	<b>15</b>
1.1.1 Arquitectura y clasificación de los GPCR	16
1.1.2 Vías de señalización	19
1.1.3 Regulación de la actividad de los GPCR	22
1.1.4 El fenómeno de la actividad constitutiva y ligandos de los GPCR	23
<b>1.2 Oligomerización de GPCR</b>	<b>25</b>
1.2.1 Interacción entre receptores acoplados a proteína G	26
1.2.2 Arquitectura de los dímeros de GPCR	27
1.2.3 Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR	30
1.2.4 Papel funcional de la dimerización	36
<b>1.3 Receptores de adenosina, dopamina y cannabinoides</b>	<b>41</b>
1.3.1 Receptores de adenosina	41
1.3.2 Receptores de dopamina	46
1.3.3 Los ganglios basales	51
1.3.4 Receptores de cannabinoides	53
<b>1.4 Interrelación entre los receptores de dopamina D<sub>2</sub>, adenosina A<sub>2A</sub> y cannabinoides CB<sub>1</sub> en el estriado</b>	<b>58</b>
1.4.1 Interacción molecular y funcional entre receptores de adenosina A <sub>2A</sub> y de dopamina D <sub>2</sub>	58
1.4.2 Interacción molecular y funcional entre receptores de cannabinoides CB <sub>1</sub> y de dopamina D <sub>2</sub>	61
1.4.3 Interacción molecular y funcional entre receptores de adenosina A <sub>2A</sub> y cannabinoides CB <sub>1</sub>	62
1.4.4 Interacción funcional entre receptores A <sub>2A</sub> de adenosina, D <sub>2</sub> de dopamina y CB <sub>1</sub> de cannabinoides	64
<b>1.5 Interacción molecular y funcional entre receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, de dopamina D<sub>2</sub> y la calmodulina</b>	<b>66</b>
<b>1.6 Relación entre los receptores de dopamina y los efectos de la cocaína</b>	<b>68</b>
1.6.1 Proteínas de unión de la cocaína	70
1.6.2 Efectos de la cocaína mediados por los receptores de dopamina D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub>	73

<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>79</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>85</b>
3.1 Detección de la heteromerización entre más de dos proteínas mediante BRET-FRET secuencial (SRET)	87
3.2 Detección de heterómeros formadazos por receptores de cannabinoides CB <sub>1</sub> , dopamina D <sub>2</sub> y adenosina A <sub>2A</sub> mediante la combinación de las técnicas de fluorescencia por complementación bimolecular y transferencia de energía de resonancia bioluminiscente	89
3.3 Relevancia de las interacciones electrostáticas en la formación de la estructura cuaternaria de heterómeros de receptores	91
3.4 Interacciones entre la calmodulina y los receptores de adenosina A <sub>2A</sub> y dopamina D <sub>2</sub>	121
3.5 La autoadministración de cocaína por periodos largos incrementa la expresión de receptores A <sub>2A</sub> de adenosina en el núcleo accumbens que revierte durante los periodos de abstinencia	123
3.6 La unión de la cocaína al receptor sigma-1 en el heterómero de receptores D <sub>1</sub> -sigma-1 modula la función del receptor D <sub>1</sub> de dopamina	125
<b>4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>159</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>181</b>
<b>6. ANEXOS</b>	<b>185</b>
6.1 Colaboraciones	187
6.1.1 Regulación dinámica de los homodímeros y heterodímeros entre los receptores CXCR1 y CXCR2	
6.2 Participación en artículos de revisión	189
6.2.1 Modulación mediante calcio de la estructura cuaternaria y función de los heterómeros de receptores A <sub>2A</sub> y D <sub>2</sub>	
6.2.2 Interacciones entre los receptores de adenosina y cannabinoides. Implicaciones en la función del estriado	
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>193</b>

## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADA	Adenosina desaminasa
AlF <sub>4</sub>	Tetrafluoruro de aluminio
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
A <sub>n</sub> R	Receptor de adenosina
Arg	Arginina
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
CaM	Calmodulina
CB <sub>n</sub> R	Receptor de cannabinoides
CK1/2	<i>Casein kinase 1/2</i>
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	<i>Dopamine and cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate regulated phospho protein, 32 KDa</i>
DAT	Transportador de dopamina
D <sub>n</sub> R	Receptor de dopamina
DsRed	Proteína fluorescente roja
EC	Bucle extracelular
EPN	Núcleo entopeduncular
ERK	<i>Extracellular regulated kinases</i>
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GIRK	<i>G-protein gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels</i>
G <sub>n</sub>	Subunidad de la proteína G
GP	Globus pallidus
GTP	Guanosina trifosfato
5HT <sub>n</sub>	Receptor de serotonina
IC	Bucle intracelular
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
kDa	KiloDalton
Kd	Constante de disociación
KO	Nnckout
L	Ligando

l	Longitud de onda
L-DOPA	Levodopa
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
NAD+	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PP	Proteína fosfatasa
RE	Retículo endoplasmático
<i>Rluc</i>	<i>Renilla luciferase</i>
RT-PCR	<i>Retro-transcriptase polymerase chain reaction</i>
Ser <sub>n</sub>	Serina
SNC	Sistema Nervioso Central
SNr	Sustancia nigra pars reticulata
SNc	Sustancia nigra pars compacta
SRET	<i>Sequential resonance energy transfer</i>
STN	Núcleo subtalámico
TMn	Segmento transmembrana
Thr <sub>n</sub>	Treonina
THC	Tetrahidrocannabinol
VTA	Área tegmental ventral
YFP	Proteína fluorescente amarilla

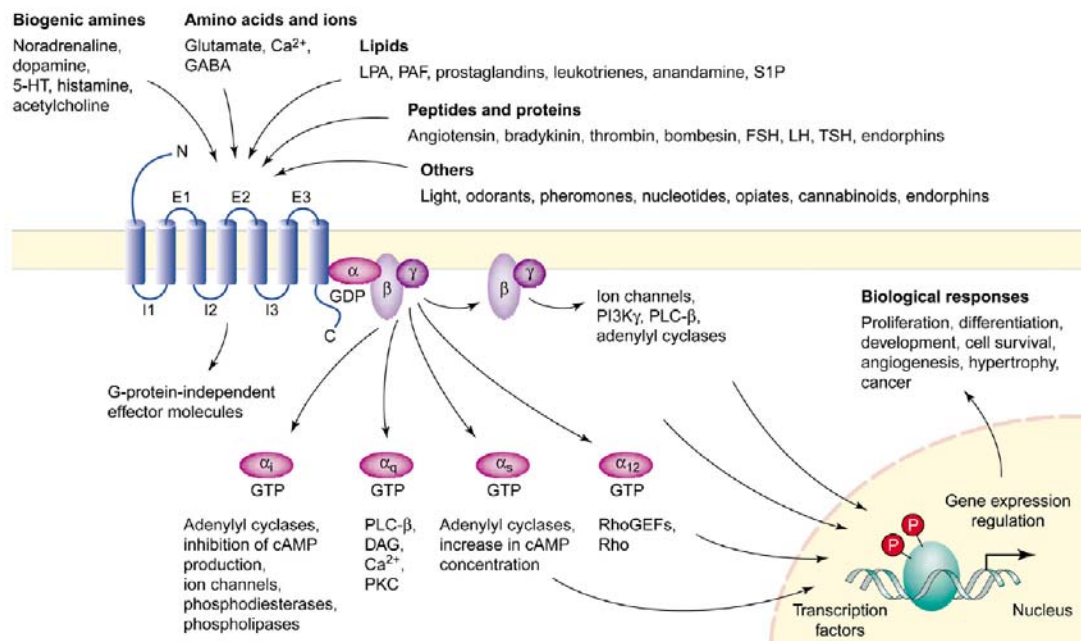
# INTRODUCCIÓN



## 1.1 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) o de siete dominios transmembrana (7TM) constituyen el mayor y más versátil grupo de receptores de superficie celular implicados en la transducción de señales (Gudermann, et al., 1997). Los GPCR están codificados por una gran familia de genes; en el caso del genoma humano, más del 1% codifica para más de 1000 proteínas de las que más del 90% se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (George, et al., 2002).

Los GPCR son activados por una gran variedad de ligandos, tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen hormonas, péptidos, aminoácidos, iones y fotones de luz. Transducen la señal a través de un gran número de efectores como las adenilato ciclasas, las fosfolipasas o los canales iónicos entre otros. Llevan a cabo multitud de funciones en el SNC y en la periferia, controlando procesos biológicos como la proliferación, la supervivencia celular, el metabolismo, la secreción, la diferenciación, las respuestas inflamatorias e inmunes o la neurotransmisión. (Marinissen y Gutkind, 2001; Gether, 2000) (Figura 1).



**Figura 1. Ligandos endógenos y mecanismos de señalización celular responsables de las diversas funciones biológicas de los receptores acoplados a proteína G. (Extraído de Marinissen y Gutkind, 2001)**

### 1.1.1 Arquitectura y clasificación de los GPCR

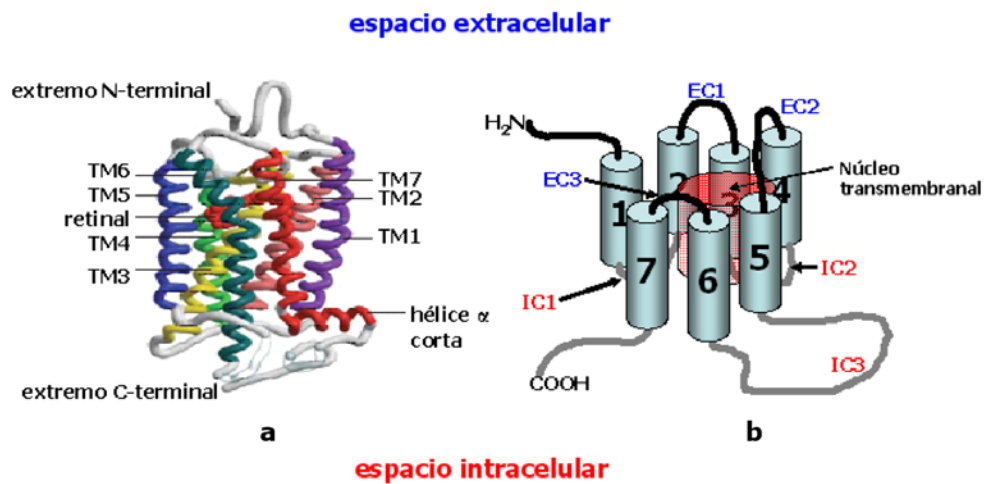
Para que una proteína sea clasificada como receptor de siete dominios transmembrana debe cumplir dos requisitos. El primero consiste en estar constituido por una sola cadena proteica capaz de cruzar siete veces la membrana plasmática. Para ello, debe presentar una estructura con siete secuencias de 25-35 residuos aminoacídicos, con alto grado de hidrofobicidad, dispuestos en una estructura de hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana celular. Estas hélices están conectadas por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares, quedando el dominio amino terminal orientado hacia el medio extracelular y el carboxilo terminal hacia el intracelular, formando así una unidad que permite que un ligando extracelular ejerza su efecto específico dentro de la célula. (Figura 2b) El segundo requisito es que este receptor tenga la capacidad de interactuar con una proteína G.

Los receptores acoplados a proteína G están parcialmente inmersos en la bicapa lipídica, en un ambiente no polar, formando una estructura compacta de hélices transmembrana. La correcta orientación e integración de la cadena polipeptídica es guiada por un complejo aparato de translocación que reside en el retículo endoplasmático (RE). Se pueden distinguir dos estados de plegamiento diferentes que se producen tras la translocación inicial del receptor a través del extremo N-terminal dentro del lumen del RE. En el primer plegamiento las hélices  $\alpha$  se disponen a través de la bicapa lipídica y el plegamiento de la proteína está dirigido principalmente por los efectos hidrofóbicos. Para minimizar la superficie polar expuesta al ambiente lipídico, los dominios transmembrana adoptan una estructura secundaria dejando los aminoácidos hidrofóbicos enfrentados a la bicapa lipídica y los aminoácidos más hidrofílicos orientados hacia la hendidura generada por el empaquetamiento de los dominios transmembrana. Finalmente, en el segundo plegamiento se forma una estructura terciaria por interacciones específicas hélice-hélice que permite un fuerte empaquetamiento con estructura tipo anillo de los dominios transmembrana (Scarselli, et al., 2000).

La primera estructura cristalina de un GPCR fue descrita en el año 2000, cuando se estudió con una alta resolución la estructura cristalina del receptor de rodopsina bovino (Palczewski, et al., 2000) (Figura 2a). Desde entonces, se han cristalizado otros GPCR (véase Weis y Kobilka, 2008 y Rosenbaum, et al., 2009 para revisión) incluyendo el receptor  $A_{2A}$  de adenosina (Jaakola, et al., 2008) y el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Cherezov, et al., 2007). Más recientemente se ha obtenido la estructura cristalina del receptor de opsina acoplado a la proteína G, lo que ha permitido una mejor interpretación de los cambios estructurales asociados a la transducción de señal (Scheerer, et al., 2008; Park, et al.,



2008).



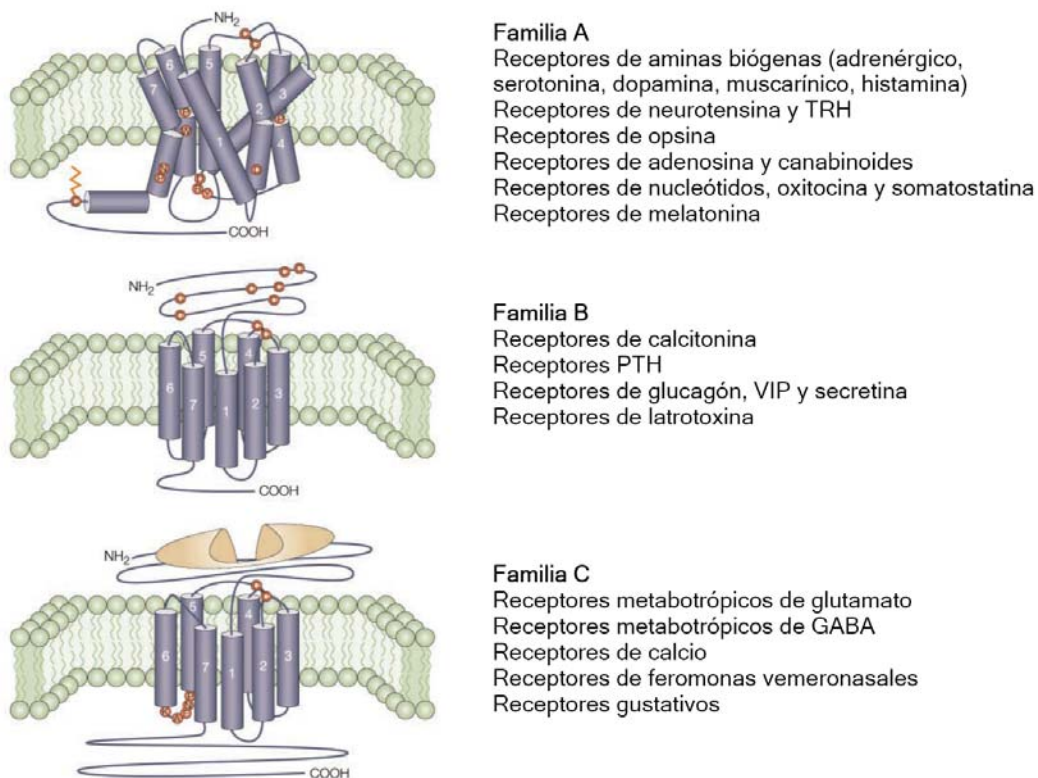
**Figura 2. a) Estructura cristalina de la rodopsina y b) esquema de la estructura típica de un GPCR** (Extraído de Palczewski, et al., 2000)

Aunque los receptores acoplados a proteína G no comparten una gran homología en su secuencia aminoacídica (Kolakowski, 1994; Probst, et al., 1992), han sido clasificados en diferentes familias según diferentes sistemas. Uno de los más clásicos es el sistema Kolakowski (Kolakowski, 1994) donde se clasifican los GPCR en 6 familias (A-F) según su estructura y características genéticas. En la figura 3 se ilustran las 3 familias mayoritarias.

La familia A, también llamada *rodopsin-like* contiene el 90% de todos los GPCR, siendo la más grande y la más estudiada, e incluye a receptores para una gran variedad de hormonas y neurotransmisores. La homología entre este tipo de receptores es baja y limitada a un número de residuos altamente conservados. Los receptores se caracterizan por tener un único residuo conservado en toda la familia que corresponde a la arginina del motivo Asp-Arg-Tyr (DRY) en el tercer segmento transmembrana (Fraser, et al., 1988). Y por tener un puente disulfuro que conecta el primer y el segundo bucle extracelular. Además, muchos receptores tienen una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal que sirve de anclaje a la membrana plasmática (Figura 3 zigzag naranja). El estudio de la estructura cristalográfica de la rodopsina indica que los dominios transmembrana están inclinados y enroscados debido al aminoácido prolina que distorsiona los dominios helicoidales transmembrana. En esta familia, el ligando se une en una cavidad formada por los dominios transmembrana, aunque para alguna subfamilia de receptores activados por pequeños péptidos, el

reconocimiento se produce a nivel de los bucles extracelulares y del dominio N-terminal (George, et al., 2002; Jacoby, et al., 2006).

La familia B incluye aproximadamente 50 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como la calcitonina o el glucagón. Esta familia se caracteriza por un extremo N-terminal relativamente largo (aproximadamente 100 residuos), que contiene diversas cisteínas que forman una red de puentes disulfuro (Ulric, et al., 1998). Son de morfología similar a la familia A, pero no parecen palmitoilarse y los residuos y motivos conservados son diferentes.



**Figura 3. Representación esquemática de las tres principales familias de receptores acoplados a proteína G.** Los residuos altamente conservados se indican en círculos rojos. (Extraído de George, et al., 2002)

La familia C se caracteriza por un largo extremo carboxi y amino terminal (500-600 aminoácidos). La estructura del lugar de unión (representada en la figura 3 en amarillo) se ha deducido mediante estudios de cristalografía del extremo N-terminal del receptor metabotrópico de glutamato solubilizado y unido a glutamato. Se ha visto que forma un dímero unido por puente disulfuro (Pin, et al., 2003) y que actúa como una planta carnívora, ya que puede abrirse y cerrarse en

el proceso de unión de ligando. Excepto por las dos cisteínas conservadas en los bucles extracelulares 1 y 2 que forman un putativo puente disulfuro, esta familia no tiene ninguna característica común con las familias A y B. Una característica única de estos receptores es un tercer bucle intracelular corto y altamente conservado. Al igual que la familia B, no se conoce la orientación de los dominios transmembrana. (George, et al., 2002; Jacoby, et al., 2006).

Las familias D y E son menores y están formadas por receptores de feromonas de levadura. Finalmente, cuatro receptores de AMP cíclico constituyen la familia F, que es muy pequeña pero única. (Kolakowski, 1994).

Aunque la clasificación A-F está ampliamente aceptada, se ha realizado un estudio filogenético de toda la superfamilia de GPCR en el genoma mamífero que ha dado lugar a una nueva clasificación más precisa (Fredriksson, et al., 2003). El análisis muestra que hay cinco familias principales para los GPCR humanos: *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* y *Secretin* (la clasificación GRAFS, basada en sus iniciales) y que dentro de cada familia los receptores comparten un origen evolutivo común. Las familias *Rhodopsin* (A), *Secretin* (B), *Glutamate* (C) se corresponden con la clasificación A-F, mientras que las otras dos familias no están incluidas en este sistema. Los autores de este nuevo sistema de clasificación defienden la teoría que los receptores acoplados a proteína G surgieron a partir de un único predecesor común, que evolucionó a través de duplicaciones génicas, desde la mayor simplicidad en cuanto a sus orígenes a la enorme complejidad que muestra esta superfamilia en la actualidad. La gran diversidad que alcanza esta superfamilia de proteínas de membrana da a entender el gran papel que juegan en la fisiología de cualquier organismo.

### 1.1.2 Vías de señalización

Los receptores acoplados a proteína G deben su nombre a la interacción con las proteínas G heterotriméricas, constituidas por las subunidades  $\alpha$  (39-46 kDa),  $\beta$  (37 kDa) y  $\gamma$  (8 kDa). Cuando el receptor es activado por un ligando, se inducen cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G que hacen que la subunidad  $\alpha$  libere GDP y una GTP. Esta acción permite un cambio conformacional entre la subunidad  $\alpha$  y las subunidades  $\beta\gamma$  distanciándolas. Tanto la subunidad  $G\alpha$  como el complejo  $G\beta\gamma$  son moléculas señalizadoras que, actuando con diferentes moléculas efectoras, pueden activar o inhibir una gran variedad de segundos mensajeros. La señal termina cuando la actividad intrínseca GTPasa de  $G\alpha$  hidroliza el GTP a GDP y fosfato (Bourne, et al., 1991).

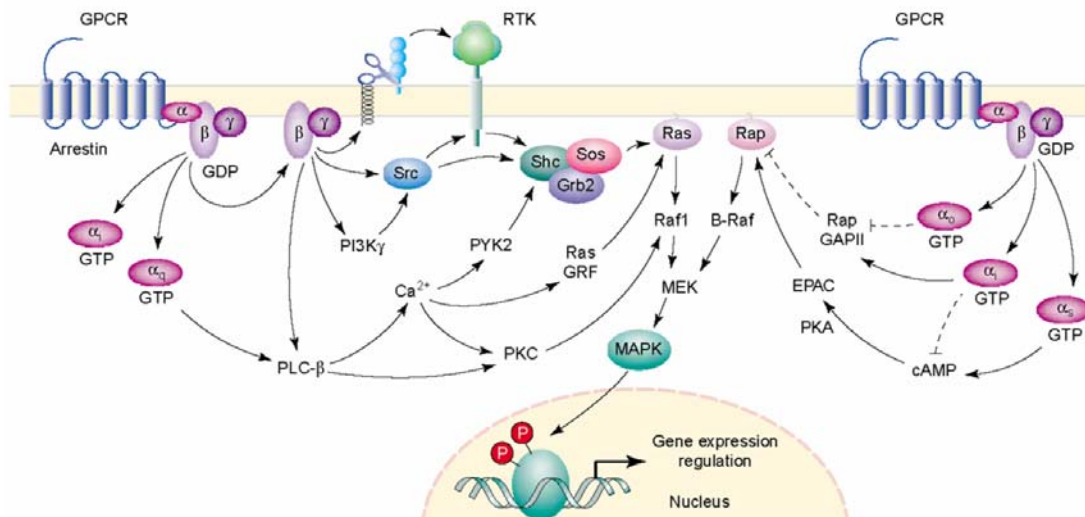
Existen cuatro grandes familias para la subunidad  $G\alpha$  en mamíferos, que se caracterizan por su estructura primaria y por la cascada de señalización que activan (Milligan y Kostenis, 2006). La familia  $G\alpha_s$  estimula la adenilato ciclasa, la  $G\alpha_{i/o}$  inhibe la adenilato ciclasa, la  $G\alpha_{q/11}$  activa la fosfolipasa  $C\beta$  ( $PLC\beta$ ) y la  $G\alpha_{12/13}$  regula las proteínas Rho.

Dos ejemplos típicos de cascadas de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteína G son las que conducen a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ )/DAG y AMPc como segundos mensajeros. Para la subunidad  $G\alpha_q$ , la proteína efectora diana es la PLC, enzima que hidroliza fosfoinositoles de membrana generando  $IP_3$  y DAG como segundos mensajeros. El  $IP_3$  aumenta la concentración de calcio intracelular vaciando los depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa a la PKC. En el caso de las subunidades  $G\alpha_s$  o  $G\alpha_i$ , la proteína efectora es la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la conversión de ATP a AMPc, mientras  $G\alpha_s$  estimula esta enzima, la subunidad  $G\alpha_i$  la inhibe. El AMPc activa la PKA que igual que la PKC fosforila a múltiples y diversas proteínas (receptores, canales iónicos, enzimas o factores de transcripción) regulando así el funcionamiento celular.

Muchas de las respuestas mediadas por estos receptores no consisten únicamente en la estimulación de segundos mensajeros convencionales, si no que son el resultado de la integración de diferentes redes de señalización, entre las que se incluyen la vía de las MAPKs y las JNKs. La activación de la ruta de las MAPK por GPCR había sido poco estudiada hasta hace poco más de una década, conociéndose sólo que el mecanismo involucraba proteína G sensible a la toxina de la *Bordetella pertussis* ( $G\alpha_{i/o}$ ) y que dependía fuertemente del complejo  $G\beta\gamma$  de la proteína G y de tirosina quinasas no identificadas (Faure, et al., 1994; Koch, et al., 1994; Van Corven, et al., 1993). Entonces, se dedujo que, en ausencia de ligandos para receptores con actividad tirosina quinasas (RTK), la activación de receptores acoplados a proteína G podía inducir la estimulación de un RTK generando señales mitogénicas. Este fenómeno se denominó transactivación. Una vez transactivado, el RTK inicia una cascada de señalización idéntica a la generada por su propio ligando; es decir, la activación de las MAPK es a través de la vía Ras, Raf, MEK y ERK (Figura 4). El proceso es iniciado con las subunidades  $G\beta\gamma$  dando lugar a que se reclute Sos hacia la membrana. Ello activa el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras, siendo esta proteína el intermediario que conecta la cascada de señalización generada por la transactivación de un RTK con la fosforilación de ERK (Marinissen y Gutkind, 2001).

Existen otras vías independientes del fenómeno de transactivación que pueden inducir la activación de Ras. Como por ejemplo, vías dependientes de la concentración de calcio intracelular inducidas por

receptores acoplados a  $G\alpha_q$  (Figura 4). Una vez Ras está activada, inicia la cascada al unirse y activar a Raf, una serina/treonina quinasa que a su vez fosforila y activa a la quinasa de ERK/MAPK (denominada MEK), enzima que fosforila residuos de serina/treonina y de tirosina. La activación de ERK requiere la fosforilación de dos residuos (treonina y serina) separados por un solo aminoácido. Esta función sólo puede ser realizada por una enzima altamente especializada, por lo que se considera a MEK una enzima limitante que hace altamente específico el proceso de activación de ERK. La activación de MEK también puede lograrse a través de B-Raf, quinasa que es activada por Rap, que a su vez es activada por la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc y por lo tanto bajo el control de receptores acoplados a  $G\alpha_s$  (Figura 4). Según la magnitud de la activación de ERK, ésta pasa del citoplasma al núcleo y regula, por fosforilación, a otras quinasas y factores de transcripción (Davis, 1995).



**Figura 4. Representación de algunas de las vías que enlazan los GPCR con la vía de las MAPK.** (Extraído de Marinissen y Gutkind, 2001)

Por otro lado, la complejidad de la señalización de los GPCR ha sido realizada por datos que indican que estos receptores pueden actuar no sólo a través de la proteína heterotrimérica G sino que también actúan por mecanismos independientes de la proteína G y de RTK y que probablemente implican la unión directa de Src y/o  $\beta$ -arrestina al receptor (Daaka, et al., 1998; Lefkowitz, 1998; Luttrell y Lefkowitz, 2002).

### 1.1.3 Regulación de la actividad de los GPCR

Cuando un agonista interacciona con un GPCR a menudo resulta en una rápida atenuación de la respuesta del receptor, este proceso, se denomina desensibilización. Este fenómeno puede manifestarse mediante diferentes mecanismos como el desacoplamiento del receptor de su proteína G en respuesta a la fosforilación del receptor (Golan, et al., 2009;Nelly, et al., 2008;Ferguson, 2001;Hausdorff et al., 1989;Lohse et al., 1990), la internalización de los receptores de la superficie celular a compartimentos intracelulares (Ferguson, 2001;Hermans, et al., 1997;Trejo, et al., 1998) y la disminución del número de receptores debido a la disminución del RNA mensajero y a la síntesis proteica, así como la degradación de los receptores preexistentes (Jockers, et al., 1999;Pak, et al., 1999). En el caso de las fosforilaciones, estos fenómenos tienen lugar en segundos, minutos en el caso de las endocitosis y horas cuando es regulada la expresión. La desensibilización del receptor puede ser completa, como ocurre en el sistema olfativo y visual o atenuada, disminuyendo la respuesta máxima, como ocurre con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Sakmar, 1998).

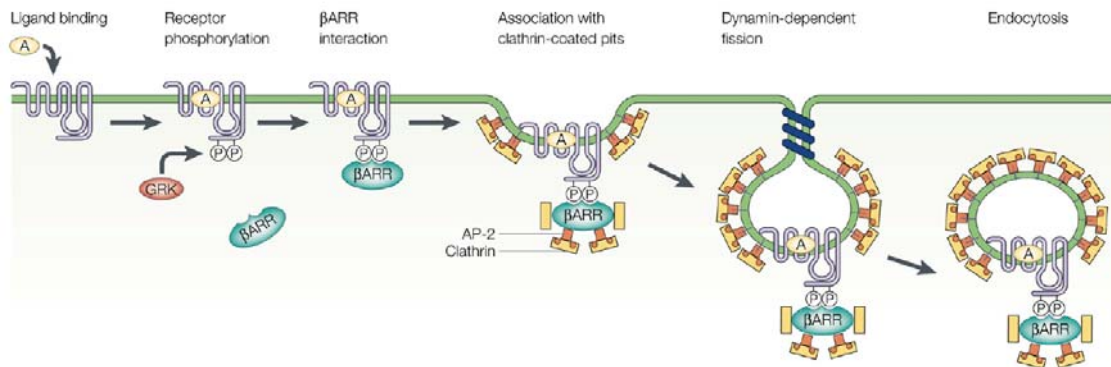
La manera más rápida por la cual un GPCR se desacopla de la proteína G es a través de modificaciones covalentes en el receptor como consecuencia de su fosforilación por quinasas intracelulares, siendo de especial importancia las quinasas específicas para GPCR o GRK (Golan, et al., 2009;Nelly, et al., 2008).

La internalización de GPCR es un fenómeno común tras la estimulación por agonista. El tráfico de receptores desacoplados a compartimentos endosomales permite la desfosforilación y reciclaje del receptor a la superficie celular (Boulay y Rabiet, 2005;Ferguson, 2001;Krueger, et al., 1997). Parte de los receptores internalizados pueden degradarse tras la exposición prolongada al agonista, lo que implica que el receptor sea marcado para entrar en la vía de degradación (Böhm, et al., 1997).

El mecanismo de internalización de GPCR mejor caracterizado es a través de la fosforilación del receptor mediada por las proteínas quinasas específicas de GPCR (GRK) y  $\beta$ -arrestinas (Kelly, et al., 2008). Una vez el receptor es fosforilado por GRK, las  $\beta$ -arrestinas actúan como moléculas reguladoras que interactúan con componentes de la vía endocítica mediada por vesículas de clatrina. En respuesta a la activación de los GPCR, las proteínas  $\beta$ -arrestina citosólicas translocan a la membrana plasmática uniéndose a los receptores a la vez que se inicia el proceso de endocitosis mediado por clatrina (Figura 5).

Algunos GPCR se han encontrado en estructuras de membrana ricas en colesterol llamadas caveolas (Chun, et al., 1994;Burgueño, et al., 2003a). Estos dominios son otro mecanismo para mediar la

internalización de un receptor inducida por ligando (Ginés, et al., 2001;Escriche, et al., 2003;Kong, et al., 2007;Wu, et al., 2008). Las caveolas también son conocidas como dominios de señalización donde los GPCR pueden localizarse e interactuar específicamente con proteínas de señalización (Ostrom e Insel, 2004).



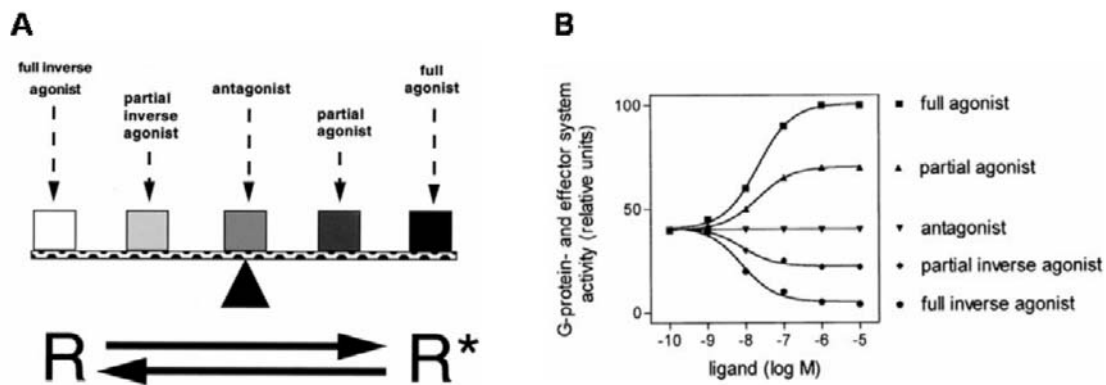
**Figura 5. Ejemplo de un modelo para la desensibilización, internalización y *down-regulation* de los GPCR.** (Extraído de Pierce y Lefkowitz, 2001)

Finalmente, la desensibilización y endocitosis de los GPCR pueden actuar como intercambiadores moleculares acoplando los receptores a una vía de señalización alternativa. Las β-arrestinas no solo funcionan en el secuestro de GPCR para la desensibilización e internalización, sino como proteínas para transducir y compartimentar las señales alternativas (Golan, et al., 2009). Ya que estas proteínas tienen la habilidad de interactuar con una gran variedad de proteínas endocíticas y de señalización como las c-Src (Lutrell, et al., 1999), MAPK y Raf (DeFea, et al., 2000a).

#### 1.1.4 El fenómeno de la actividad constitutiva y ligandos de los GPCR

La activación de un receptor acoplado a proteína G se explica como un cambio de conformación que sufre el receptor una vez unido al 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 y Wenzel-Seifert, 2002). Como consecuencia de este cambio en el equilibrio conformacional del receptor, se produce el cambio de GDP por GTP en las proteínas G acopladas a receptor, aumentando la actividad basal de dicha proteína G y de los subsiguientes sistemas efectores (Costa, et al., 1989).

Los receptores acoplados a proteína G pueden encontrarse en múltiples conformaciones con distintas actividades biológicas. Estas conformaciones están estabilizadas por la unión del receptor a diferentes tipos de ligandos, siendo la más favorable para la señalización del receptor aquella estabilizada por un agonista total. Los agonistas parciales tienen una menor eficiencia para estabilizar al receptor en la conformación más activa y por lo tanto promueven un menor intercambio de GDP a GTP. A continuación están los agonistas inversos parciales y los agonistas inversos totales, que son capaces de estabilizar al receptor en su estado inactivo, en menor o mayor grado respectivamente, reduciendo la actividad basal o constitutiva del receptor. Por último están los antagonistas neutros o simplemente antagonistas, que no alteran el equilibrio entre la forma activa y la inactiva, pero tienen la capacidad de bloquear el efecto de los agonistas (Figura 6).



**Figura 6. Activación de los receptores acoplados a proteína G según el modelo de dos estados.** A) Modelo de dos estados que asume la isomerización del receptor de un estado inactivo R a uno activo R\*. B) Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre la actividad constitutiva del receptor. (Extraído y modificado de Seifert y Wenzel-Seifert 2002).

La mayoría de ligandos de los GPCR que actúan como agonistas, antagonistas o agonistas inversos, se unen al mismo dominio del receptor reconocido por los agonistas endógenos, el lugar de unión ortostérico (Neubig, et al., 2003). En cambio, muchos GPCR poseen sitios alostéricos topográficamente distintos. Esto ha llevado a la identificación de ligandos que actúan como moduladores alostéricos, que pueden regular indirectamente la actividad de los ligandos ortostéricos y/o mediar directamente efectos agonista/agonista inverso (Christopoulos, 2002; May, et al., 2007; Gilchrist, 2007; Bridges y Lindsley, 2008).



## 1.2 OLIGOMERIZACIÓN DE GPCR

Las características estructurales y la localización subcelular de los receptores acoplados a proteína G permite a estos receptores interactuar con otras proteínas tanto en el lado intracelular como extracelular de la membrana plasmática, así como también, exhibir interacciones proteína-proteína con otros receptores o canales iónicos a nivel de membrana plasmática (Franco, et al., 2003).

Los GPCR tienen una topología que permite su interacción con una amplia variedad de proteínas. Estas interacciones determinan las propiedades del receptor, como la compartimentación celular o la selección de una señal y pueden promover el ensamblaje en complejos que integran una función. Las proteínas que interactúan con los GPCR están involucradas principalmente en la organización de estructuras supramoleculares en las cuales se incluye todo tipo de receptores, proteínas implicadas en la transducción de señal e incluso proteínas citoesqueléticas (Franco, et al., 2003).

En el espacio extracelular, donde tiene lugar la unión a ligando, las regiones de los GPCR implicadas en la interacción con proteínas son, en la mayoría de casos, secuencias presentes en el extremo amino-terminal, ya que los bucles extracelulares son muy cortos. Existen crecientes evidencias de que las interacciones receptor-proteína extracelulares pueden jugar un papel importante en la farmacología de los GPCR. Un ejemplo, es la enzima adenosina desaminasa (ADA), proteína multifuncional que puede estar presente en la superficie de la célula o anclada a diferentes proteínas como los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2B</sub> (Saura, et al., 1996; Herrera, et al., 2001; Gracia, et al., 2009). Estas interacciones parecen ser esenciales para que estos receptores muestren el estado de alta afinidad por su ligando.

En la cara intracelular, tanto el extremo carboxi-terminal como el tercer bucle intracelular pueden presentar un tamaño considerable en los GPCR. Por lo que son estas regiones las más probables para interactuar con proteínas implicadas en la señalización o en la localización subcelular, mediadas por asociación a proteínas citoesqueléticas o relacionadas con el tráfico de receptores. Estas interacciones pueden ser transitorias o mucho más estables. Un ejemplo de proteína citosólica que interactúa con GPCR sería la calmodulina (CaM), un pequeño péptido con capacidad para unirse a distintos dominios citoplasmáticos de diferentes GPCR, entre los que se encuentra el extremo C-terminal del receptor A<sub>2A</sub> de adenosina o el tercer bucle intracelular del receptor D<sub>2</sub> de dopamina, desarrollando una señal dependiente de calcio (Bofill-Cardona, et al., 2000; Woods, 2004).

A nivel de la membrana plasmática, desde mediados de los años 90, diversos estudios han demostrado la oligomerización de numerosos GPCR (George, et al., 2002). Hoy en día, se acepta que la oligomerización es un hecho común en la biología de estos receptores y que pueden formar homodímeros, heterodímeros y/u oligómeros de orden superior (Agnati, et al., 2003;Bouvier, 2001;Devi, 2001;Franco, et al., 2003;Prinster, et al., 2005;Carriba, et al., 2008;Ferre, et al., 2009). Cuando un GPCR participa en un oligómero pueden cambiar sus características funcionales, así la oligomerización confiere nuevas propiedades a los receptores, lo que establece un posible mecanismo para generar nuevas funciones en estos receptores. Este fenómeno ha dado lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas.

### 1.2.1 Interacción entre receptores acoplados a proteína G

Tradicionalmente los mecanismos de unión de ligando y de transducción de señal para los receptores acoplados a proteína G se basaban en el supuesto de que éstos actuaban como monómeros o proteínas independientes con estequiometría 1:1 respecto a su proteína G. Pero desde mediados de los años 90, diversos estudios han demostrado la oligomerización de numerosos GPCR y la relevancia que esto supone para su regulación.

Ciertas evidencias farmacológicas indirectas llevaron a pensar a los investigadores en la posibilidad de que los receptores acoplados a proteína G podían actuar como dímeros. Las complejas curvas de unión, tanto de agonistas como de antagonistas de estos receptores, se interpretaron como evidencias de una cooperatividad que se podía explicar mediante interacciones entre monómeros en complejos diméricos o multiméricos (Franco, et al., 1996;Wreggett y Wells, 1995).

Maggio y colaboradores, utilizando quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y  $M_3$  muscarínicos compuestas de los cinco primeros dominios transmembrana de uno de los receptores y los dos últimos dominios del otro receptor y viceversa, realizaron estudios de complementación y coinmunoprecipitación y sugirieron la formación de heterodímeros (Maggio, et al., 1993). Cuando cada quimera se expresaba independientemente no se observaba unión ni señalización tras la exposición a ligando, pero cuando ambas eran cotransfectadas se recuperaba la unión y la señalización tanto para ligandos adrenérgicos como muscarínicos.

La dimerización de los GPCR no está limitada a la homodimerización, asociación física entre proteínas idénticas, sino que también es la

asociación de un receptor con otro receptor o proteína distinta, heteromerización. Esta asociación puede ser entre dos monómeros para formar dímeros o entre múltiples monómeros para formar oligómeros. El término dímero es a menudo usado entendiendo que es la forma más simple de una unidad funcional oligomérica, debido a la dificultad de la distinción entre dímeros u oligómeros con las técnicas actuales.

Las interacciones entre GPCR son cruciales para entender el variado *cross-talk* que se observa entre receptores de neurotransmisores. La oligomerización de receptores permite formular hipótesis sobre el alto grado de diversidad y plasticidad que es característico de una estructura altamente organizada y compleja como es el cerebro. Se ha descrito un nivel superior de organización por el que los receptores acoplados a proteína G forman estructuras compuestas no sólo por homo- o heterodímeros, sino por complejos supramoleculares formados por varios receptores y una variedad de proteínas que modifican la actividad del receptor (RAMPs: *Receptor Activity Modifying Proteins*). Estos complejos interactúan tanto a lo largo de la membrana (interacciones horizontales), como a través de ella (interacciones verticales), y al ser activados por hormonas o neurotransmisores se redistribuyen en la membrana dando lugar a *clusters*. Los *clusters* supondrían un nivel superior de regulación de los receptores y enzimas asociadas y podrían ser regulados por otros receptores en estos complejos y por otras moléculas que no interactúan físicamente con ellos, pero sí se comunican entre ellos en el *cluster* (Franco, et al., 2003).

El número creciente de publicaciones en este campo ha hecho necesario establecer nuevas definiciones y dotar de nomenclatura a los homómeros y heterómeros de GPCR, como recientemente han publicado Ferré y colaboradores (Ferre, et al., 2009).

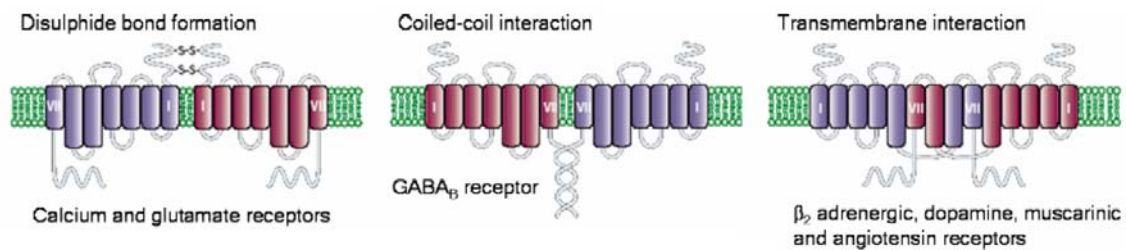
### 1.2.2 Arquitectura de los dímeros de GPCR

Para explicar el fenómeno de la dimerización de los receptores acoplados a proteína G se pueden considerar dos posibilidades: que estas interacciones sean directas, implicando contacto entre ambos receptores, o indirectas, cuando son necesarias otras proteínas que hagan de puente, como pueden ser las proteínas del citoesqueleto.

En las interacciones indirectas, los dominios intracelulares de los GPCR se unen a un gran número de proteínas citosólicas, algunas de las cuales han sido propuestas como posibles candidatas a participar en la dimerización de los receptores con los que interactúan. Muchas de estas proteínas son proteínas andamio o *scaffolding proteins* que proporcionan una estructura compleja en la que diversos receptores

pueden interactuar entre ellos y con otras proteínas involucradas en la transducción de señal, controlando la velocidad y especificidad de dicha señalización (Ciruela, et al., 2005).

Se cree que en el caso de las interacciones directas, los oligómeros se forman en el retículo endoplasmático, por lo que no son modulables por ligando, entendiendo la modulación como la formación o destrucción del oligómero. La gran complejidad estructural que existe en esta superfamilia no permite pensar en un único mecanismo de interacción directa (Bouvier, 2001). Así pues, las interacciones directas pueden tener lugar mediante enlaces covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (fuerzas hidrofóbicas y/o electrostáticas) entre los dominios transmembrana y los dominios intracelulares de los receptores (Figura 7).



**Figura 7. Determinantes moleculares de la dimerización de GPCR.** (Extraído de Bouvier, 2001)

Se han encontrado distintas interacciones intermoleculares involucradas en varios homómeros y heterómeros de GPCR. 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 (Robbins, et al., 1999; Romano, et al., 1996; Romano, et al., 2001). Este es el caso de los receptores sensibles a calcio y los metabotrópico de glutamato, así como de algunos receptores de la familia A como los receptores  $\kappa$ - y  $\delta$ -opioides o los receptores D<sub>1</sub> de dopamina, entre otros (Cvejic y Devi, 1997; Jordan y Devi, 1999). También han sido descritas interacciones donde el dominio C-terminal de los receptores es fundamental, como la homodimerización del receptor  $\delta$ -opiode (Cvejic y Devi, 1997) o la interacción directa *coiled-coil* de la cola de los receptores GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> (Margeta-Mitrovic, et al., 2000; White, et al., 1998). Finalmente, la dimerización directa entre GPCR puede estar mediada por interacciones iónicas o hidrofóbicas entre los dominios extracelulares, intracelulares o transmembrana del receptor. Se ha demostrado la existencia de interacciones iónicas entre péptidos presentes en los dominios intracelulares que contienen respectivamente dos o más cargas positivas adyacentes (RR, KK o RKR)

y dos o más cargas negativas (DD o EE) o residuos aminoacídicos fosforilados (Woods y Huestis, 2001). Un ejemplo de estas interacciones sería la participación de residuos cargados y/o fosforilados en la heteromerización de los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina (Ciruela, et al., 2004). 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  $\beta$ -adrenérgico. Mediante el uso de péptidos sintéticos y mutagénesis dirigida se propuso que residuos concretos de glicina y leucina situados en el sexto dominio transmembrana del receptor estaban involucrados en su dimerización (Hebert, et al., 1996). Las interacciones entre dominios transmembrana han sido también propuestas como implicadas en la homodimerización de receptores de dopamina (Ng, et al., 1996). Sin embargo, todos estos mecanismos de interacción propuestos, más que reflejar diferentes estrategias utilizadas por diferentes clases de receptores, indican que múltiples sitios de interacción están implicados en el ensamblaje y la estabilización de los dímeros.

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

Ambos modelos se esquematizan en la figura 8. El primer modelo se conoce como *domain swapping model*, o modelo del intercambio de dominio y considera que cada unidad funcional en el dímero está compuesta por los cinco primeros dominios transmembrana de un receptor y los dos últimos del otro. Así, si ambos dominios por separado de un mismo receptor se coexpresan conjuntamente se recupera el receptor funcional (Scarselli, et al., 2000). Este modelo racionaliza la complementación funcional observada por Maggio y colaboradores con las quimeras de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico y  $M_3$  muscarínico (Maggio, et al., 1993) que se ha comentado anteriormente.

El segundo modelo es el de contacto y considera que el dímero se formaría por empaquetamiento lateral de monómeros individuales, donde los dominios cinco y seis de cada monómero formarían la interfase de interacción. Éste sería el caso para el receptor  $V_2$  de vasopresina (Schultz, et al., 2000).

Sin embargo, la validación de estos modelos aún está pendiente, probablemente a la espera de la resolución de la estructura del oligómero de GPCR.

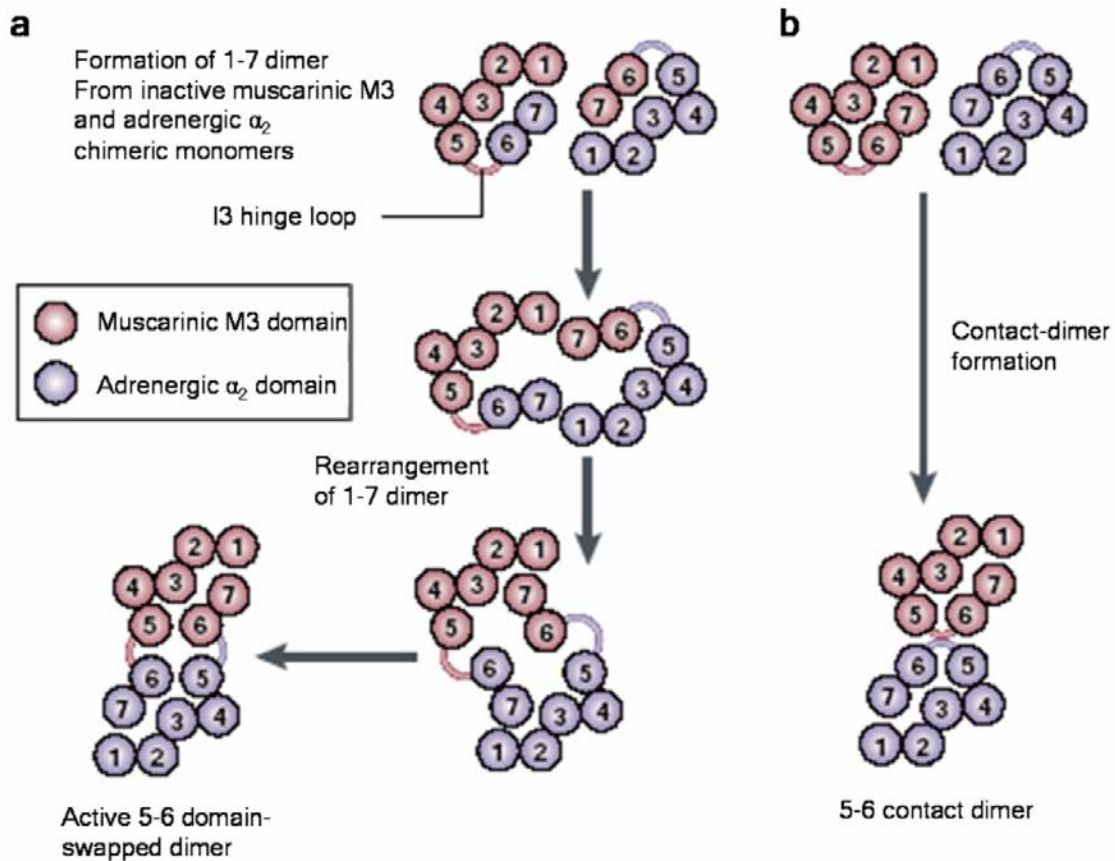


Figura 8. Modelos tridimensionales de la dimerización de GPCR. (Extraído de Bouvier, 2001)

### 1.2.3 Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR

Mediante estudios farmacológicos se obtuvieron las primeras evidencias de la existencia de homodímeros entre GPCR. Las complejas curvas de unión, tanto de agonistas como de antagonistas de estos receptores, se interpretaron considerando la existencia de una cooperatividad positiva o negativa, que se podía explicar mediante interacciones entre los sitios de unión de los receptores dentro de complejos diméricos u oligoméricos (Wreggett y Wells, 1995; Limbird, et al., 1975; Mattera, et al., 1985; Hirschberg y Schimerlik, 1994; Franco, et al., 1996). Una evidencia contundente de la existencia de hetero-oligómeros la constituyen los cambios cinéticos en la unión de radioligandos a un receptor provocados por la unión de ligandos no radioactivos al otro receptor del heterómero, utilizando membranas aisladas de células o de tejido que expresen los dos receptores. En preparaciones de membrana no existe ninguna maquinaria celular que pueda producir un *cross-talk* indirecto (por ejemplo, un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros) y la explicación más sencilla de la existencia de una modulación a nivel de unión de radioligandos es la existencia de una interacción molecular entre ambos

receptores. En estos casos la unión de un ligando a un receptor induce cambios conformacionales en el otro receptor que modulan su capacidad de unir a su ligando y estos cambios sólo se pueden producir si ambas proteínas interactúan molecularmente directa o indirectamente (Franco, et al., 2007; Franco, et al., 2008a). En muchos casos esta clase de interacción se ha encontrado en tejido nativo, hecho que puede ser interpretado como un indicador de la existencia de receptores heteroméricos *in-vivo* (González-Maeso, et al., 2008; Marcellino, et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, el elegante estudio llevado a cabo por Maggio (Maggio, et al., 2003), utilizando receptores mutantes y quimeras, que demostraba que los GPCR pueden funcionar como dímeros, fue un estudio pionero en la utilización de mutantes para demostrar la oligomerización de GPCR. En esta línea se ha observado que distintos receptores mutantes actúan de dominantes negativos cuando son expresados con el receptor en la forma nativa (*wild-type*) (Benkirane, et al., 1997; Bai, et al., 1998; Zhu y Wess, 1998). En estos casos, la dimerización entre el receptor *wild-type* y el receptor inactivo es la única explicación de este fenómeno.

Una de las técnicas bioquímicas más usadas para investigar la dimerización de GPCR ha sido la coimmunoprecipitación de receptores marcados con epítomos diferentes. El primer estudio que utilizó esta técnica demostró la interacción específica entre los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Hebert, et al., 1996). Desde entonces, estrategias similares han sido usadas para documentar la homodimerización de los receptores metabotrópico mGlu<sub>5</sub>R (Romano, et al., 1996),  $\delta$ -opioides (Cvejic y Devi, 1997) y serotonina 5-HT<sub>2c</sub> (Herrick-Davis, et al., 2004), entre otros. Los estudios de coimmunoprecipitación también han sido utilizados para demostrar la heterodimerización de receptores del mismo neurotransmisor, como GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> (Jones, et al., 1998; Kaupmann, et al., 1998; White, et al., 1998) o como los  $\kappa$ - y  $\delta$ -opioides (Jordan y Devi, 1999), e incluso entre receptores menos relacionados como los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y dopamina D<sub>1</sub> (Ginés, et al., 2000), los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y metabotrópico mGlu<sub>5</sub> (Ferré, et al., 2002) o los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y de dopamina D<sub>2</sub> (Kearn, et al., 2005).

Aunque se utiliza comúnmente para estudiar las interacciones proteína-proteína, la coimmunoprecipitación de GPCR requiere la solubilización de las membranas mediante detergentes, lo que puede provocar la formación de dímeros artefactuales por una solubilización incompleta, debida a la naturaleza hidrofóbica de estos receptores. Pese a todos los controles usados para descartar esta posibilidad, la aceptación generalizada de la dimerización de GPCR dependía de una demostración

directa de que estos complejos existen en células vivas. Esto fue posible con el desarrollo e implementación de métodos biofísicos basados en la transferencia de energía por resonancia (RET: *resonance energy transfer*).

En 1948 Theodor Förster formuló la teoría de transferencia de energía por resonancia (Förster, 1948) que más tarde fue aplicada al estudio de interacciones entre GPCR. Esta aproximación biofísica está basada en la transferencia de energía no radiativa (dipolo-dipolo) desde un cromóforo en estado excitado (dador) a una molécula cercana que absorbe (aceptor). En el caso de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET; *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), tanto el dador como el acceptor son moléculas fluorescentes, mientras que en la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET; *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) el dador es bioluminiscente y el acceptor es fluorescente.

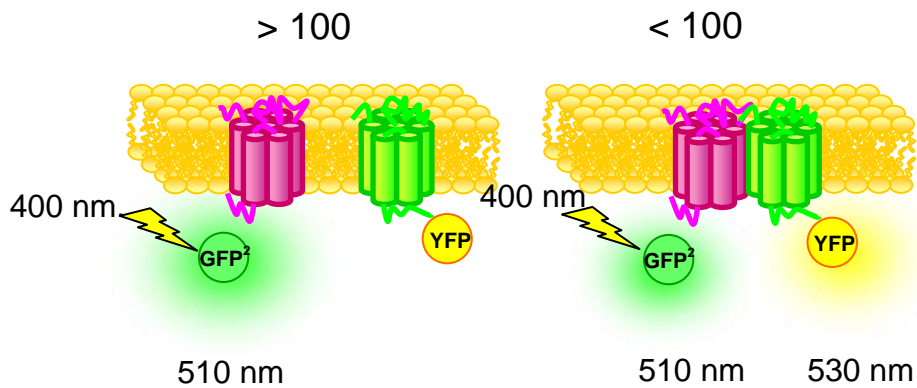
Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. El primero, consiste en que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del acceptor se solapen, de forma que parte de la energía de emisión del dador se transfiera de forma directa al fluoróforo acceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. El segundo requisito es que dador y acceptor estén muy próximos en el espacio ( $< 100 \text{ \AA}$  o 10 nm). Además, la eficiencia de la transferencia va a disminuir con la sexta potencia de la distancia (figura 8).

Hay que destacar que entre 10 y 100  $\text{\AA}$  se encuentran la mayor parte de complejos multiproteicos de una célula (Stryer, 1978; Sheng y Hoogenraad, 2007). Así, las técnicas de transferencia de energía ofrecen una aproximación única que permite detectar la dimerización de proteínas en células vivas, sin perturbar el entorno donde este fenómeno ocurre.

Para la técnica de FRET se utilizan las diferentes variantes de la proteína fluorescente verde (GFP: *Green Fluorescence Protein*) obtenidas por mutación. Estas mutaciones confieren diferentes propiedades espectrales, de forma que utilizando dos formas diferentes de mutantes, con las características espectrales adecuadas, fusionadas a las proteínas en estudio, nos permiten determinar si estas están lo suficientemente cercanas como para transferirse energía. La pareja más ampliamente utilizada para los experimentos de FRET son las variantes GFP<sup>2</sup> que se excita a 400nm y emite a 510nm y la variante YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) que se excita a 485nm y emite a 530nm. En la técnica de FRET, como se esquematiza en la figura 9, cuando un haz de luz excita la proteína GFP<sup>2</sup>, esta emite fluorescencia a 510nm y si ambas proteínas están suficientemente próximas en el espacio, tendrá lugar una



transferencia de energía y la proteína fusionada a YFP emitirá fluorescencia con un pico a 530nm (Gandia, et al., 2008b;Pfleger y Eidne, 2005).



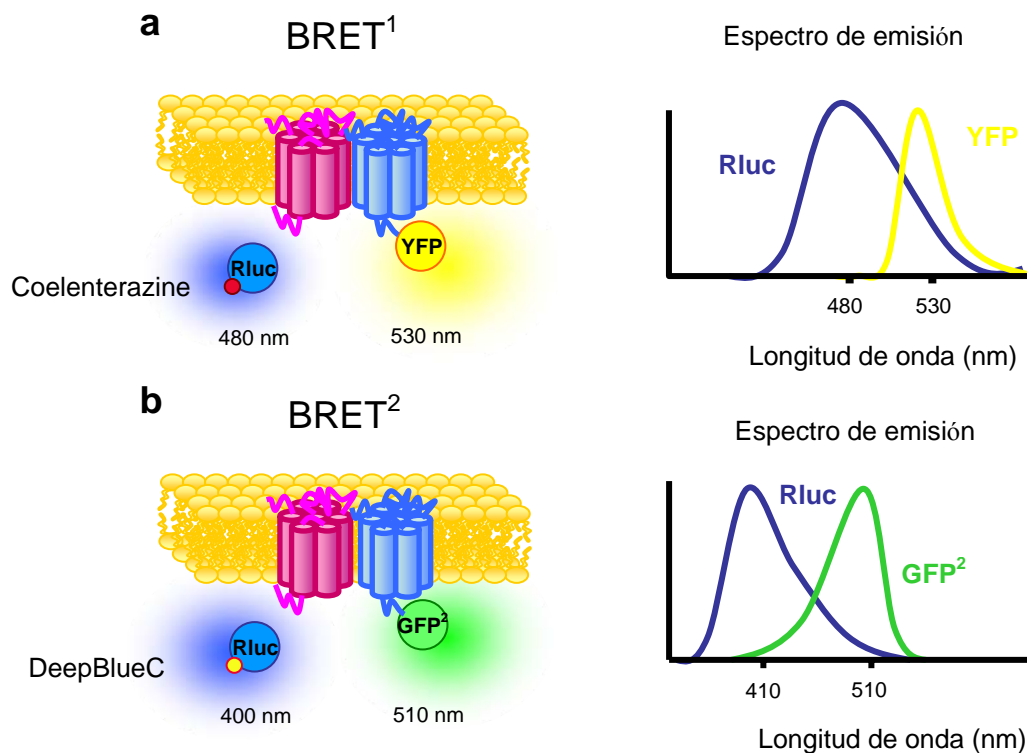
**Figura 9. Esquema del fenómeno de FRET.**

Similar al FRET y con los mismos requerimientos, cabe considerar la técnica de transferencia de energía por resonancia bioluminiscente, BRET. En esta técnica, la bioluminiscencia es el resultado de la degradación catalítica de cierto sustrato por la enzima luciferasa (*Rluc*) en presencia de oxígeno, generando luz. Esta luz es transferida a una variante de la proteína GFP, la cual a su vez emite fluorescencia a una longitud de onda característica si ambas proteínas están lo suficientemente cerca, indicando la dimerización de las proteínas fusionadas a *Rluc* y a GFP (Gandia, et al., 2008b;Pfleger y Eidne, 2005).

Se han descrito dos variantes de esta técnica, el BRET<sup>1</sup> y el BRET<sup>2</sup>. En el BRET<sup>1</sup> la enzima *Rluc* metaboliza el sustrato coelenterazine H generando luz con un pico de emisión de 480nm, emisión que permite excitar a la proteína YFP que emitiría a 530nm. En el BRET<sup>2</sup> el sustrato DeepBlueC es oxidado por la *Rluc* emitiendo luz a 400nm de forma que puede excitar a la proteína GFP<sup>2</sup> que emitiría a 510nm (Figura 10).

Las ventajas de este fenómeno han sido utilizadas por los investigadores para el estudio de la dimerización de GPCR. Se generan proteínas de fusión que unen en el extremo carboxi terminal de un receptor la proteína fluorescente GFP o una de sus variantes y en el otro receptor la proteína luminiscente *Rluc*, y se co-expresan. Mediante estas técnicas de transferencia de energía se ha demostrado la existencia de homodímeros de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgico (Angers, et al., 2000),  $\delta$ -opioides (McVey, et al., 2001) y A<sub>2A</sub> de adenosina (Canals, et al., 2004) entre otros. También se ha realizado una aproximación similar para el estudio de heterómeros de receptores acoplados a proteína G, como por ejemplo

entre los receptores de somatostatina  $SSTR_{2A}$  y  $SSTR_{1B}$  (Rocheville, et al., 2000b), los receptores  $SSTR_{1B}$  de somatostatina y los  $D_2$  de dopamina (Rocheville, et al., 2000a), los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $D_2$  de dopamina (Canals, et al., 2003), los receptores  $A_1$  y  $A_{2A}$  de adenosina (Ciruela, et al., 2006), los receptores  $A_{2A}$  de adenosina y  $CB_1$  de cannabinoide (Carriba, et al., 2007), los receptores  $D_1$  o  $D_2$  de dopamina y  $H_3$  de histamina (Ferrada, et al., 2008; Ferrada, et al., 2009) o los receptores  $D_1$  y  $D_3$  de dopamina entre otros (Marcellino, et al., 2008).



**Figura 10. Representación esquemática de los fenómenos de BRET<sup>1</sup> y BRET<sup>2</sup> con sus correspondientes espectros de emisión.**

En los últimos años, se han desarrollado variaciones de la técnica de FRET como el *photobleaching* FRET o el *time-resolved* FRET (Pfleger y Eidne, 2005). Uno de los resultados más interesantes se ha obtenido recientemente utilizando el microscopio de transferencia de energía por resonancia en milisegundos. Con esta técnica se ha demostrado un *cross-talk* conformacional entre el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico y  $\mu$ -opioide (Vilardagà, et al., 2008). La unión de morfina al receptor  $\mu$ -opioide desencadena un cambio conformacional en el receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico ocupado por norepinefrina que inhibe su señalización.

El descubrimiento de técnicas como BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*) ha aportado una nueva forma muy eficaz para detectar interacciones proteína-proteína en células vivas. Esta técnica utiliza dos fragmentos no fluorescentes de la proteína sYFP (nYFP y cYFP). Cuando la proteína sYFP se reconstituye a partir de la interacción directa entre dos proteínas fusionadas con estos fragmentos, se genera una señal fluorescente (Hu, et al., 2002) (Figura 11). Esta señal sólo se genera si las proteínas de fusión están muy próximas en el espacio (menos de 6 nm). Más adelante, en la misma línea de investigación, se han desarrollado técnicas que utilizan dos fragmentos de la proteína *Rluc*. Cuando las proteínas fusionadas a estos fragmentos interactúan se reconstituye la proteína *Rluc* enzimáticamente activa (Paulmurugan, et al., 2003). Finalmente, muy recientemente, se ha desarrollado la técnica de multicolor BiFC (mcBiFC) que utiliza diferentes fragmentos de diferentes proteínas facilitando la investigación de redes de complejos de proteínas reguladoras (Gehl, et al., 2009).

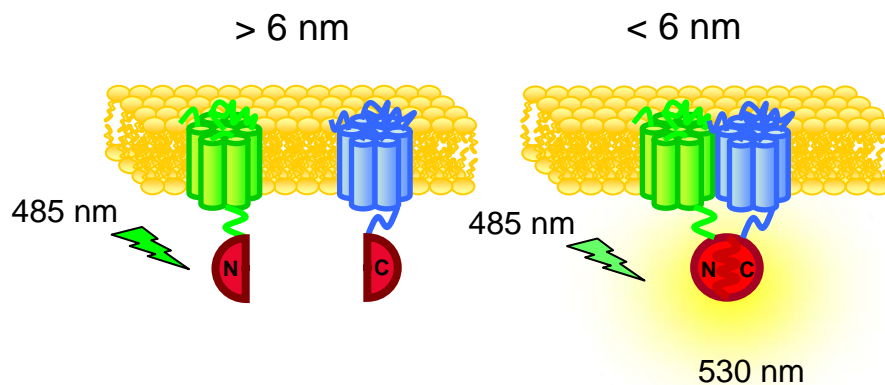
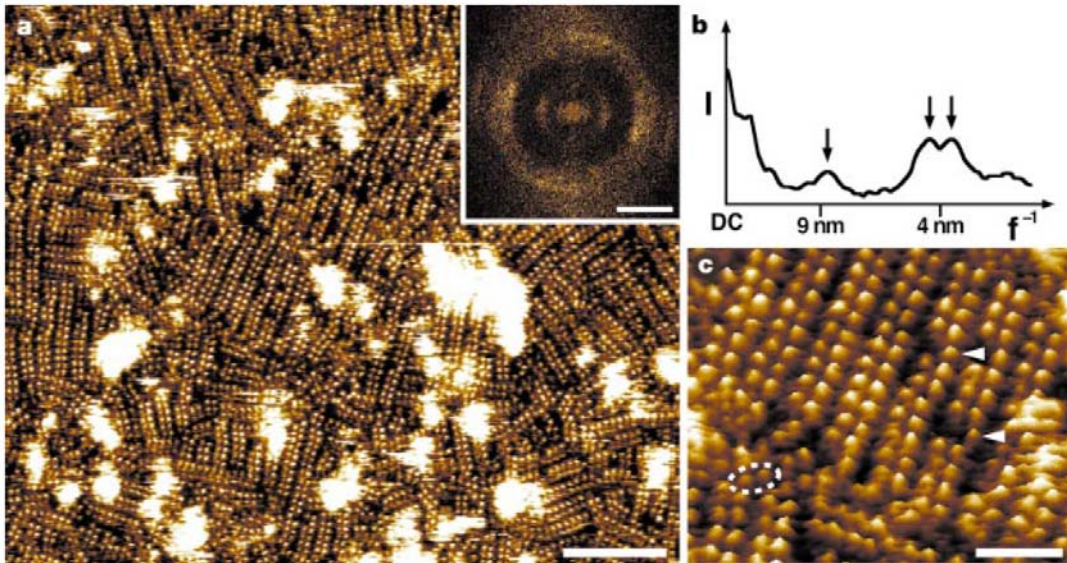


Figura 11. Esquema de la *Bimolecular Fluorescence Complementation* (BiFC).

Muchos de los estudios que caracterizan la dimerización de GPCR han sido llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos. Pero un estudio estructural realizado por Palczewski (Fotiadis, et al., 2003), utilizando microscopía de fuerza atómica en tejido de discos de retina, ha demostrado, por primera vez, que la rodopsina se estructura de forma multi-dimérica. (Figura 12).



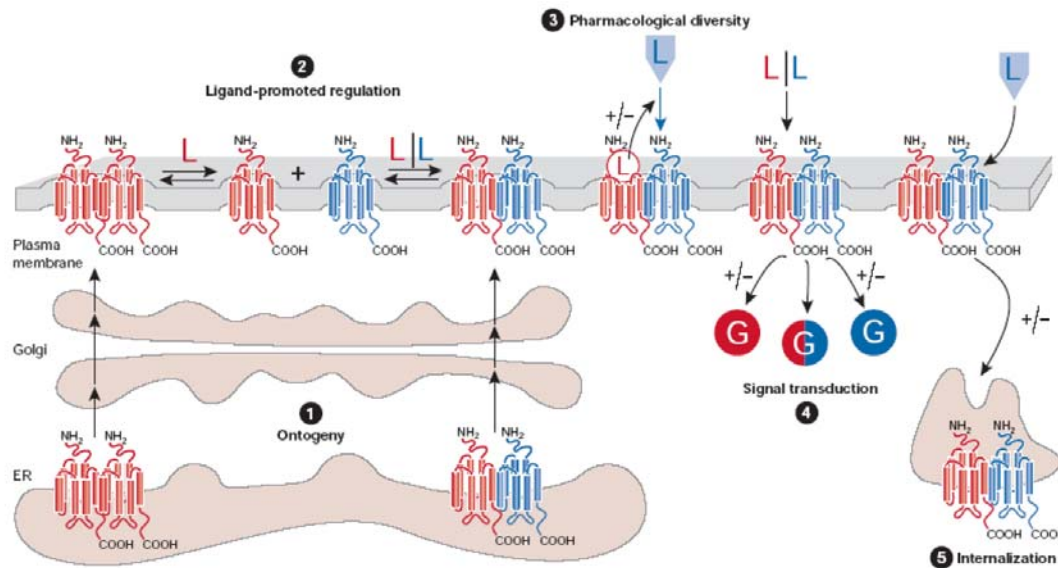
**Figura 12. Organización y topografía de la superficie citoplasmática de la rodopsina.** Topografía obtenida usando microscopía de fuerza atómica, mostrando una distribución paracrystalina de los dímeros de rodopsina en el disco membranoso nativo. (Extraído de Fotiadis, et al., 2003)

#### 1.2.4 Papel funcional de la dimerización

La disponibilidad de un gran número de técnicas para el estudio de la dimerización de GPCR ha facilitado enormemente la investigación del papel funcional de estos receptores. La dimerización está implicada en la regulación de la funcionalidad del receptor a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferir nuevas propiedades farmacológicas a los receptores expresados en el dímero. Esto ha proporcionado una nueva perspectiva para considerar cual es la unidad de señalización de los GPCR, además de una nueva vía para el diseño de drogas que actúen a través de estos receptores.

Aunque en muchos casos la relevancia fisiológica no se conoce completamente, diversos estudios llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos han sugerido distintos papeles funcionales para la oligomerización de GPCR (Figura 13). Por ejemplo, la oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de GPCR, es decir, en el control de calidad del plegamiento y de la destinación a la membrana de receptores sintetizados de *novo*. Asimismo, en algunos casos, se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando. También se ha constatado que la oligomerización confiere diversidad farmacológica,

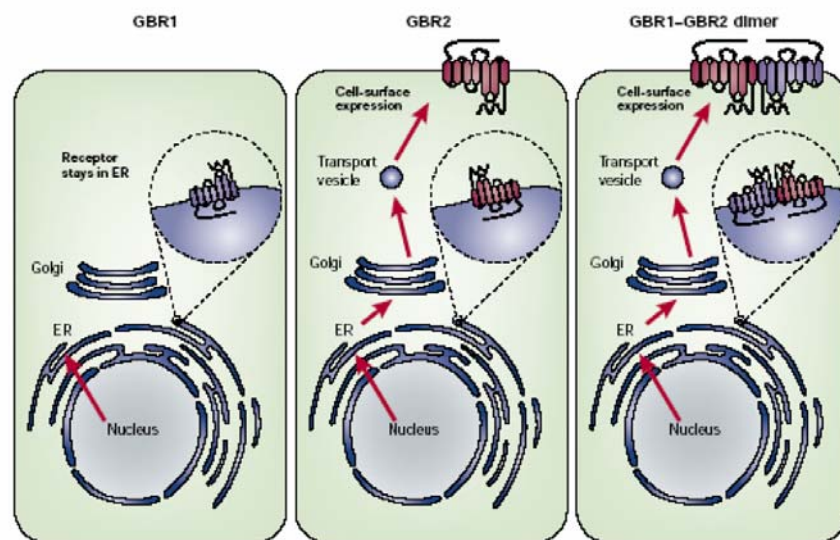
ya que la unión de un ligando a un receptor del dímero puede influir en la unión de otro ligando al segundo receptor dentro del dímero (Ferré, et al., 2007; Franco, et al., 2008b). La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado ligando afectando la selectividad de interacción entre el receptor correspondiente y su proteína G, resultando en una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G. Finalmente también se ha visto que la oligomerización puede alterar el patrón endocítico para un determinado receptor (Terrillon y Bouvier, 2004).



**Figura 13. Posibles papeles funcionales de la oligomerización de GPCR.** ER, retículo endoplasmático, L, ligando. (Extraído de Ellis, et al., 2004)

Hasta hace poco, un ejemplo claro de la funcionalidad de la dimerización entre receptores lo constituían los receptores metabotrópicos  $GABA_B$ , donde la heteromerización de los receptores  $GABA_{B1}$  y  $GABA_{B2}$  es necesaria para el correcto plegamiento del receptor y su transporte a la membrana plasmática, además de para su señalización. Tres estudios simultáneos aparecidos en 1998 demostraban que era necesaria la coexpresión de las dos isoformas del receptor  $GABA_B$ ,  $GABA_{B1}$  y  $GABA_{B2}$ , para la formación del receptor funcional en membrana (Jones, et al., 1998; Kaupmann, et al., 1998; White, et al., 1998). Cuando se expresa individualmente la isoforma  $GABA_{B1}$  del receptor, ésta queda retenida intracelularmente en el retículo endoplasmático como glicoproteína inmadura. Por el contrario, cuando es la isoforma  $GABA_{B2}$  la que se expresa, ésta sí es capaz de llegar a la membrana plasmática pero no puede unir GABA ni iniciar la transducción de señal. Cuando ambos receptores se coexpresan, las dos proteínas alcanzan la superficie celular

y forman el receptor funcional (White, et al., 1998). En estudios posteriores se ha demostrado que GABA<sub>B2</sub> sirve como una chaperona esencial para el apropiado plegamiento y transporte a la superficie celular de GABA<sub>B1</sub> (Margeta-Mitrovic, et al., 2000). Estas evidencias, junto al hecho de que un mutante de la isoforma GABA<sub>B1</sub> con capacidad de alcanzar la membrana plasmática tampoco es por si solo capaz de iniciar la transducción de señal, sugirieron que el heterodímero es la unidad funcional (Margeta-Mitrovic, et al., 2000) (Figura 14). Sin embargo, teniendo en cuenta las recientes definiciones sobre receptores aportadas por un grupo de expertos (Ferré, et al., 2009), que definen a un receptor como una macromolécula o conjunto mínimo de macromoléculas capaces de inducir una señalización y teniendo en cuenta que los receptores pueden tener estructura cuaternaria, se debería considerar a la unidad funcional GABA<sub>B1</sub>-GABA<sub>B2</sub> como un único receptor heteromérico. Es decir, como un receptor con una determinada estructura cuaternaria y no un heterómero de receptores GABA (Ferré, et al., 2009).



**Figura 14. Heteromerización de los receptores GABA<sub>B1</sub>/GABA<sub>B2</sub>.** (Extraído de Bouvier, 2001)

El papel de la oligomerización como un evento temprano en la maduración y transporte del receptor se ha demostrado claramente mediante la observación de que la expresión de formas truncadas de los receptores de vasopresina V<sub>2</sub> y quimiocina CCR5 provoca la retención intracelular de los homodímeros correspondientes, causando diabetes nefrogénica insípida y una lenta aparición de los efectos del SIDA, respectivamente (Benkirane, et al., 1997; Zhu y Wess, 1998).

En este mismo sentido cabe mencionar que la oligomerización también puede modular las propiedades de tráfico de GPCR mediadas por

agonista. Este es el caso de los heterodímeros de los receptores de somatostatina SSTR<sub>1</sub> y SSTR<sub>5</sub>, en el cual la internalización del heterodímero ocurre a pesar de la resistencia a la internalización que presenta el monómero SSTR<sub>1</sub> (Rocheville, et al., 2000b).

Existen evidencias que indican que, en un gran número de casos, la biogénesis de los dímeros u oligómeros de la familia A de los GPCR ocurre tempranamente durante la biosíntesis del receptor y el procesamiento en el RE y Golgi. Esto podría tener un importante papel en el control de calidad de los receptores recién sintetizados (Herrick-Davis, et al., 2006). Una vez se encuentran los receptores en la membrana plasmática, consideraciones teóricas y experimentales sugieren que el estado dimérico de los GPCR representa la unidad funcional básica del receptor, que se acopla a la proteína heterotrimérica G y exhibe características funcionales y/o farmacológicas que difieren de la de los monómeros que los constituyen (Bulenger, et al., 2005).

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

Se ha demostrado que la unión de un ligando específico a un receptor en un dímero puede alterar la unión de un ligando específico para el receptor vecino, sugiriendo un posible mecanismo donde un ligando modula la eficacia y/o potencia de otro ligando. Un caso interesante es el de los receptores de dopamina y adenosina, entre los que se ha descrito una cooperatividad negativa. Los agonistas del receptor A<sub>1</sub> inducen la desaparición del estado de alta afinidad en preparaciones de membrana que contienen el receptor de dopamina D<sub>1</sub> (Ginés, et al., 2000), y la estimulación del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> reduce la afinidad de agonistas por el receptor de dopamina D<sub>2</sub> (Ferré, et al., 1991a). Otro caso de especial interés es el heterodímero formado por los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> de adenosina, en el que la estimulación del receptor A<sub>2A</sub> disminuye

enormemente la afinidad del receptor  $A_1$  por su agonista e inhibe la señalización (Ciruela, et al., 2006). Teniendo en cuenta que la afinidad por la adenosina del receptor  $A_1$  es más grande que la que muestra el receptor  $A_{2A}$  en este heterómero  $A_1/A_{2A}$ , cuando la concentración de adenosina es pequeña, el neuromodulador se une al receptor  $A_1$  inhibiendo la liberación de glutamato en el estriado. Cuando la concentración de adenosina es elevada, por ejemplo en casos de hipoxia, la adenosina se une también al receptor  $A_{2A}$  provocando en el heterómero la inhibición farmacológica y funcional del receptor  $A_1$ . En estas condiciones la adenosina estimula la liberación de glutamato en el estriado (Ciruela, et al., 2006). El heterómero  $A_1/A_{2A}$  actúa como un interruptor mediante el cual, según sea la concentración de adenosina en el medio, se produce la inhibición o la estimulación de la liberación de glutamato en el estriado (Ciruela, et al., 2006).

Una de las primeras evidencias de que los dímeros forman una unidad compleja de señalización proviene de estudios que muestran que la disrupción del homodímero  $\beta_2$ -adrenérgico con un péptido derivado del sexto dominio transmembrana, implicado en la dimerización, inhibe la producción de AMPc inducida por el agonista (Hebert, et al., 1996). Estos resultados indican que el dímero es la especie activa del receptor, aunque tampoco se puede descartar la posibilidad de que el péptido esté modificando interacciones intramoleculares dentro del monómero que provocan la falta de funcionalidad, siendo la pérdida de la unidad dimérica más bien una consecuencia y no una causa de la no señalización por parte del receptor. En el mismo sentido, AbdAlla describe que la heterodimerización entre los receptores  $A_{T1}$  y  $B_2$  de bradiquinina, mejora la señalización de  $A_{T1}$ , mientras que inhibe la del receptor  $B_2$  (AbdAlla S, et al., 2000). En 2004, se demostró que los receptores de dopamina  $D_1$  y  $D_2$  forman heterómeros en células transfectadas (Lee, et al., 2004). Los receptores  $D_1$  están acoplados a proteína  $G_s$  mientras que los  $D_2$  están acoplados a la proteína  $G_i$ . Pero cuando los receptores  $D_1$ - $D_2$  forman el heterómero, se acoplan a una proteína G diferente,  $G_{q/11}$ . De hecho, cuando la dopamina activa a los receptores  $D_1$  y  $D_2$  en el heterómero, no da lugar a la señalización vía PKA y AMPc sino que moviliza calcio y activa la calmodulin quinasa (Rashid, et al., 2007). Finalmente, en nuestro grupo se ha descrito que los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  heterodimerizan, y que es necesaria la activación del receptor  $A_{2A}$  para que el receptor  $CB_1$  inhiba la producción de AMPc en el heterómero (Carriba, et al., 2007).

Actualmente se cree que la organización física de los GPCR y proteínas G asociadas están a favor de un modelo en el cual una simple proteína G interactúa con un receptor en un dímero (Baneres y Parelló, 2003; Filipek, et al., 2004; Fotiadis, et al., 2004). Estudios recientes con el



receptor de glutamato, demostraron que sólo una subunidad del receptor por cada dímero puede alcanzar un estado activo completo al mismo tiempo (Goudet, et al., 2005; Hlavackova, et al., 2005), lo que ha llevado a proponer que la proteína G es la responsable de este funcionamiento asimétrico de un dímero. Damián publicó la primera demostración experimental de esta propuesta usando el dímero del receptor de leucotrieno BLT1 (Damián, et al., 2006).

### 1.3 RECEPTORES DE ADENOSINA, DOPAMINA Y CANNABINOIDES

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

#### 1.3.1 Receptores de adenosina

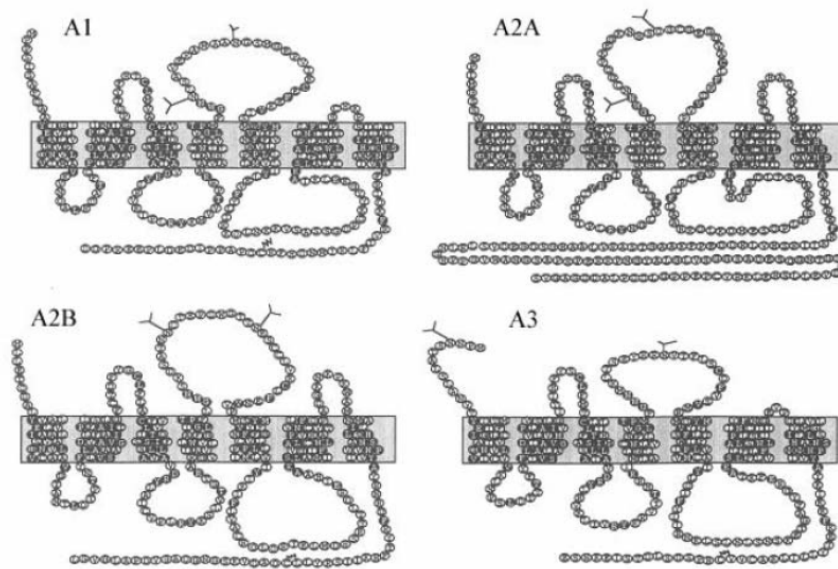
La adenosina es un nucleósido endógeno formado por la base purínica adenina y ribosa. Tanto la adenosina como sus derivados son constituyentes esenciales de toda célula viva, ya que conforman piezas claves para la formación de moléculas biológicas tan relevantes como los ácidos nucleicos, los nucleótidos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

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

En el SNC la adenosina es secretada por la mayoría de células, incluyendo neuronas y células gliales, y actúa como neuromodulador de la actividad del SNC tanto a nivel presináptico, postsináptico y/o extrasináptico. Así, la adenosina se ha visto implicada en procesos normales y patofisiológicos, como la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Phillis, et al., 1979; Ciruela, et al., 2006), la inhibición de la actividad motora espontánea, la diferenciación y migración neuronal (Rivkees, et al., 1995, 2001; Svenningsson, et al., 1999; Canals, et al., 2005), el conocimiento y la memoria (Fredholm, et al., 2000; Fontinha, et al., 2009), la regulación de la función respiratoria y en particular en aquellos procesos relacionados con el sueño (Antle, et al., 2001; Bjorness, et al., 2009; Longordo, et al., 2009), la ansiedad (Johansson, et al., 2001) y la excitación, además de la neuroprotección en episodios de hipoxia/isquemia (Moreau y Huber., 1999; Burnstock, 2009). También se ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Maia y DeMendonca., 2002), la enfermedad de Parkinson (Schwarzschild, et al., 2002; Jenner, et al., 2009), la enfermedad de Huntington (Reggio, et al., 1999; Popoli, et al., 2008), la esquizofrenia (Ferré, et al., 1997; Wardas, 2008), la epilepsia (Dunwiddie y Masino., 2001; Ribeiro, et al., 2003), la adicción a drogas (Maldonado, et al., 1996; Manzoni, et al., 1998; Knapp, et al., 2001; Brown y Short, 2008) y la plasticidad sináptica (Ribeiro, et al., 2002).

Como se ha comentado, la adenosina lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con diferentes receptores de membrana acoplados a proteína G. Estos receptores se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas en 4 subtipos: los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Ribeiro, et al., 2002) (Figura 15).

La adenosina, mayoritariamente, lleva a cabo la neuromodulación a través de la activación de sus receptores de alta afinidad: A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>. Los receptores de adenosina A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> son de baja afinidad por lo que su activación puede ser relevante en condiciones en las que la concentración de adenosina se ve incrementada de forma notoria. Los receptores de adenosina participan en distintos procesos como el sueño, la vigilia, el aprendizaje, la memoria, el daño neuronal, la neurodegeneración y la maduración neuronal.



**Figura 15. Estructura de los receptores de adenosina humanos.**

El grado de homología entre los receptores de adenosina es bajo, del orden del 45% (Stehle, et al., 1992; Pierce et al., 1992), si bien existen diferencias entre especies como la que tiene lugar entre los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  que en rata presentan una homología del 46% y en humano del 61%. Al igual que para otros GPCR, la mayor homología tiene lugar en las regiones transmembranales, que se cree están próximas entre sí formando el centro de unión de ligando conjuntamente con la zona hipervariable correspondiente a la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular (Fredholm, et al., 1994; Rivkees, et al., 1999). La interacción con la proteína G tiene lugar básicamente en el tercer bucle intracelular (IC3) y en el extremo C-terminal. Cabe destacar la larga cola carboxi terminal que presenta el receptor  $A_{2A}$ . Además, todos presentan secuencias consenso de fosforilación en los dominios intracelulares. Esta fosforilación está implicada en el mecanismo de desensibilización de los receptores de adenosina (Ramkumar, et al., 1991; Palmer, et al., 1994; Saura, et al., 1998). Todos los receptores de adenosina presentan secuencias consenso de N-glicosilación en el EC2, que se cree que están implicadas en el tránsito del receptor a la membrana (Klotz y Lohse, 1986; Stiles, 1986).

Dado que la adenosina participa en una gran variedad de funciones del SNC, es fácil suponer que los diversos subtipos de receptores estarán acoplados a diferentes señales intracelulares. Así, el receptor  $A_1$  que se acopla a proteínas  $G_{i/o}$  (Freissmuth, et al., 1991; Munshi, et al., 1991; Kiesman, et al., 2009) provoca la inhibición de la AC (Londos, et al.,

1980) y la activación de la PLC con el consiguiente incremento en los niveles de DAG e IP<sub>3</sub> en el interior celular (Gerwins y Fredholm, 1992), lo que aumenta los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares. También provoca la inactivación de los canales de Ca<sup>2+</sup> (Macdonald, et al., 1986) y la activación de varios tipos de canales de K<sup>+</sup>, probablemente vía las subunidades G<sub>βγ</sub> de la proteína G (Trussell y Jackson, 1985). El receptor A<sub>3</sub> también inhibe la AC mediante el acoplamiento a G<sub>i</sub> (Zhou, et al., 1992), aunque también puede acoplarse a la proteína G<sub>q</sub> (Palmer, et al., 1995) activando la PLC e incrementando los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares (Abbraccio, et al., 1995).

La principal vía de señalización de los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> es la estimulación de la formación de AMPc a través de G<sub>s</sub> (Jenner, et al., 2009), lo que a su vez estimula a la proteína kinasa dependiente de AMPc (PKA), regulando de esta manera el estado de fosforilación de varios sustratos intracelulares. Sin embargo, el receptor A<sub>2A</sub> también puede acoplarse a proteínas G<sub>olf</sub> y el receptor A<sub>2B</sub> a proteínas G<sub>q</sub> mediando la activación de la PLC y la movilización de calcio intracelular dependiente de DAG e IP<sub>3</sub> (Feoktistov y Biaggioni, 1995) (Tabla 1).

**Tabla 1. Receptores de adenosina**

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

Se ha observado que todos los receptores de adenosina activan a las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) y en concreto inducen la fosforilación de ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), pero dependiendo del contexto celular, las vías de señalización implicadas pueden variar (Schulte y Fredholm, 2003; Seidel, et al., 1999).

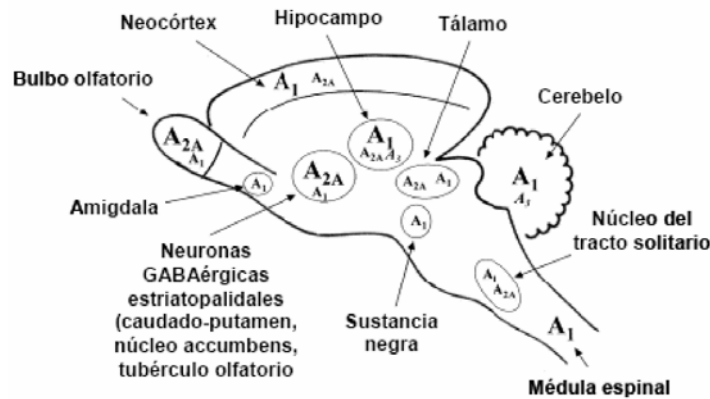
Aunque la adenosina es el agonista endógeno, no es una buena herramienta para el estudio de estos receptores debido a su alta susceptibilidad para ser metabolizada por varios enzimas. Sin embargo, la adenosina es la base estructural de todos los agonistas conocidos. Existen tres posiciones en la molécula sensibles a ser modificadas para incrementar la afinidad para cada subtipo específico de receptor sin destruir la actividad como agonista: la posición 5' de la ribosa y las posiciones 2 y 6 del anillo de la adenina (Choi, et al., 2009; Baraldi, et al., 2006).

Las metilxantinas constituyen el prototipo de antagonista de los receptores de adenosina. Las modificaciones sobre esta molécula dan lugar a una elevada selección de derivados, muchos de los cuales presentan selectividad por distintos subtipos. Como base para la síntesis de antagonistas diferentes de xantina se han usado compuestos como las triazoloquinazolininas, triazolotriacinas, dihidropiridinas y ciertas derivaciones de la estructura de la adenosina. En la tabla 1 se muestra la afinidad que presentan por la adenosina los diferentes subtipos y los agonistas y antagonistas más selectivos para cada miembro de la familia (Cristalli, et al., 2009).

Muy recientemente se ha determinado la estructura cristalográfica del receptor  $A_{2A}$  humano unido al antagonista selectivo de alta afinidad ZM 241385, con una resolución de 2.6 Å (Jaakola, et al., 2008). El ligando está unido en una conformación extendida y perpendicular a la membrana, interaccionando con los bucles extracelulares y hélices transmembrana. Este nuevo estudio puede ayudar al diseño de nuevos ligandos más selectivos así como a la comprensión de la estructura de los GPCR. Este trabajo es de gran relevancia ya que, hasta ahora y para esta familia, únicamente se había obtenido la estructura cristalográfica del receptor de rodopsina (Palczewski, et al., 2000) y del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Cherezov, et al., 2007).

En el cerebro, los dos principales subtipos de receptores de adenosina, el  $A_1$  y el  $A_{2A}$ , se expresan tanto de forma pre- como postsináptica (Figura 16). El receptor  $A_1$  se localiza abundantemente en todo el cerebro, en concreto su expresión es alta en el córtex, cerebelo, hipocampo y en la médula espinal. El receptor  $A_{2A}$  tiene una expresión más restringida, está altamente expresado en las neuronas GABAérgicas

estriatopálidas, en el bulbo olfatorio y en pequeñas cantidades en otras regiones cerebrales (Ribeiro, et al., 2002).



**Figura 16.** Distribución de los receptores de adenosina en el SNC. (Extraído de Ribeiro, et al., 2003)

A nivel sináptico, la adenosina no es un neurotransmisor, pero a través de la activación de los receptores  $A_1$  comparte muchas propiedades atribuidas al principal neurotransmisor inhibitorio, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Así, el GABA y la adenosina constituyen las principales moléculas en el control de la transmisión sináptica glutamatérgica en el SNC. La adenosina, a través de los receptores  $A_1$ , inhibe la liberación de glutamato lo que permite desconectar fisiológicamente interneuronas GABAérgicas. Este proceso es importante en condiciones de intensa liberación de adenosina, como en los casos de hipoxia (Sebastiao, et al., 2001). Respecto al receptor de adenosina  $A_{2A}$ , parece ser que es uno de los principales neuromoduladores presinápticos (Schiffmann, et al., 2007) capaz de incrementar la liberación de GABA de terminales nerviosos del hipocampo (Cunha y Ribeiro, 2000).

### 1.3.2 Receptores de dopamina

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro) y controla una gran variedad de funciones como la modulación de la actividad sensorial, la actividad motora, la actividad endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la afectividad y la motivación (Missale, et al., 1998).

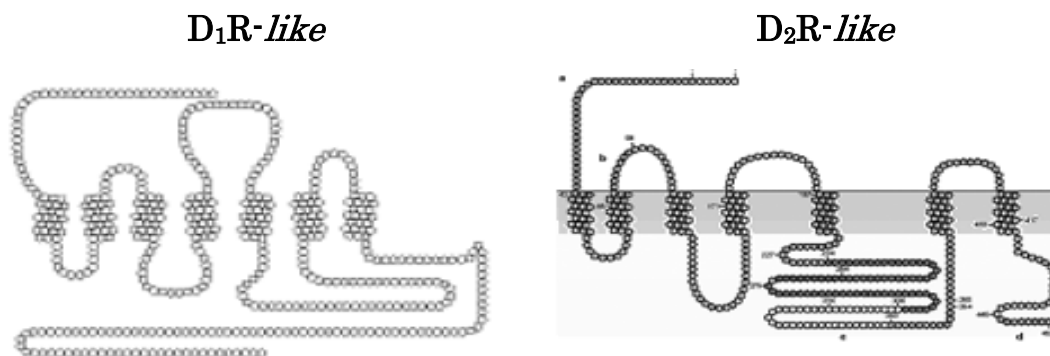
La dopamina no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, así pues, su biosíntesis tiene lugar en el citosol de los terminales nerviosos dopaminérgicos (Elsworth y Roth, 1997). Su liberación se realiza

mediante canales de calcio dependientes de voltaje que promueven la fusión de vesículas llenas de dopamina con la membrana plasmática, que por difusión cruza el espacio de la hendidura sináptica hasta unirse a sus receptores localizados pre- y postsinápticamente. El resultado final es la activación o inhibición de la neurona postsináptica. La señal dopaminérgica finaliza por eliminación de la dopamina del espacio intersináptico. Este proceso se lleva a cabo mediante la catálisis de la dopamina por enzimas extraneuronales o por la recaptación por los propios terminales nerviosos mediante transportadores específicos (DAT: *Dopamine Transporters*) que juegan un papel importante en la función, inactivación y reciclaje de la dopamina liberada (Adell y Artigas, 2004; Sotnikova, et al., 2006). Los receptores presinápticos son principalmente autoreceptores y constituyen uno de los mecanismos responsables de la regulación de la transmisión dopaminérgica (Koeltzow, et al., 1998). Son más sensibles a la dopamina que los receptores postsinápticos e inducen a una inhibición de la liberación continuada de dopamina. El sistema dopaminérgico ha sido de gran interés por la relación entre la desregulación de este sistema y algunas patologías tales como el Parkinson, la esquizofrenia, el síndrome de Tourette, la hiperprolactinemia y la adicción a drogas (Missale, et al., 1998; Segawa, 2003; Santini, et al., 2008; Zack y Poulos, 2009; Dalley y Everitt, 2009).

El 1978, en base a evidencias farmacológicas y bioquímicas, los receptores de dopamina se clasificaron en dos grupos: receptores activadores de la adenilato ciclasa (AC) y receptores inhibidores de la AC (Spano, et al., 1978). Sin embargo, posteriormente, usando técnicas de clonaje, se han aislado 5 receptores distintos para la dopamina (Gingrich y Caron, 1993). Estos receptores se han clasificado en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: los receptores *D<sub>1</sub>-like*, que comprende los receptores *D<sub>1</sub>* y *D<sub>5</sub>* y los receptores *D<sub>2</sub>-like* que comprende los receptores *D<sub>2</sub>*, *D<sub>3</sub>* y *D<sub>4</sub>*. La subfamilia *D<sub>1</sub>-like*, producen incrementos de AMPc a través de proteínas  $G_{s/olf}$  que estimulan la AC y se localizan principalmente en los terminales sinápticos (Civelli, et al., 1993). La *D<sub>2</sub>-like* inhibe la AC por acoplamiento a proteínas  $G_{i/o}$ , además de activar canales de  $K^+$  y disminuir la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales dependientes de voltaje. Los receptores *D<sub>2</sub>-like* pueden localizarse en terminales presinápticos y postsinápticos (Dal Toso, et al., 1989; De Mei, et al., 2009).

La organización genómica de los receptores de dopamina sugiere que provienen de dos familias génicas que difieren principalmente por la presencia o no de intrones en su secuencia codificadora. Los receptores *D<sub>1</sub>-like* no contienen intrones, característica que comparten con la mayoría de GPCR (Dohlman, et al., 1987). En cambio, y por analogía con

el gen de rodopsina, los genes que codifican para los receptores *D<sub>2</sub>-like* están interrumpidos por intrones (Vallone, et al., 2000). La presencia de intrones en la región codificadora de los receptores *D<sub>2</sub>-like*, permite la generación de variantes de estos receptores. De hecho, el receptor *D<sub>2</sub>* presenta dos isoformas, llamadas *D<sub>2s</sub>R* (*short*) y *D<sub>2l</sub>R* (*long*), que son generadas por *splicing* alternativo de 87 pares de bases entre los intrones 4 y 5. Esta diferencia de 29 aminoácidos confiere ciertas características diferenciales entre ellos. Pese a que tanto *D<sub>2s</sub>R* como *D<sub>2l</sub>R* tienen la misma capacidad de unir ligando, la isoforma larga se expresa diez veces más que la isoforma corta. También difieren en la capacidad de acoplarse a proteína G, *D<sub>2l</sub>R* sería más afín a *G<sub>i</sub>* y *D<sub>2s</sub>R* tanto a *G<sub>i</sub>* como a *G<sub>o</sub>*, esto explicaría la regulación de diferentes respuestas biológicas por la diversidad de señal generada. Los dos subgrupos presentan, además, peculiaridades estructurales diferenciales como se muestra en la figura 17: los receptores *D<sub>1</sub>-like* tienen un dominio carboxilo terminal unas siete veces más largo que los *D<sub>2</sub>-like*, mientras que estos últimos tienen el tercer bucle intracelular (IC3) muy largo, característica común en muchos receptores acoplados a la proteína *G<sub>i</sub>* (Missale, et al., 1998).



**Figura 17. Representación esquemática de las dos familias de receptores de dopamina.**

Existe una alta homología de secuencia entre los dos miembros de la familia de receptores *D<sub>1</sub>-like*, del orden del 80%. Entre los miembros del subgrupo *D<sub>2</sub>-like* la homología es de un 75% entre los receptores *D<sub>2</sub>* y *D<sub>3</sub>* y de un 53% entre los receptores *D<sub>2</sub>* y *D<sub>4</sub>*. Por el contrario, la homología entre los receptores *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like* es solo del 42-46%. La homología más elevada se encuentra entre los dominios transmembrana y en aquellos residuos que son clave para la unión de catecolaminas. El extremo carboxi terminal, en ambas familias, contiene lugares de fosforilación y palmitoilación que se cree juegan un papel importante en



la desensibilización del receptor y en la formación de un cuarto bucle intracelular, respectivamente. En contraste, los receptores de dopamina presentan diferencias en las modificaciones post-traduccionales, como diferentes lugares consenso de N-glicosilación.

Para el estudio de las propiedades farmacológicas de los receptores de dopamina se dispone de ligandos que fácilmente discriminan entre las dos subfamilias *D<sub>1</sub>-like* y *D<sub>2</sub>-like*, aunque no son selectivos para los miembros de cada subfamilia. Puesto que los receptores *D<sub>1</sub>-like* tienen alta homología dentro de los dominios transmembrana, regiones que se piensa forman el lugar de unión para ligando, no es sorprendente que estos receptores exhiban propiedades farmacológicas muy similares. Cada uno de los receptores *D<sub>1</sub>-like* muestra alta afinidad por benzazepinas (agonistas) y baja afinidad por butiroferonas y benzamidas sustituidas (antagonistas). Una diferencia remarcable entre los receptores *D<sub>1</sub>-like* es la afinidad que presentan sus miembros por la dopamina, el receptor *D<sub>5</sub>* tiene una afinidad 10 veces superior a la que muestra el receptor *D<sub>1</sub>* (Missale, et al., 1998).

Las propiedades farmacológicas de los receptores *D<sub>2</sub>-like* difieren más que las que muestran los *D<sub>1</sub>-like*. Así, las afinidades por muchos agonistas y antagonistas varían entre uno y dos órdenes de magnitud entre subtipos, incluyendo la dopamina por la que el receptor *D<sub>3</sub>* tiene una afinidad unas 20 veces más alta que el receptor *D<sub>2</sub>*. Cada uno de estos receptores, sin embargo, tiene el sello característico de unión de ligando de los receptores *D<sub>2</sub>*, es decir, alta afinidad por butirofenonas, como las espiperonas y haloperidol, y baja afinidad por benzazepinas. El receptor *D<sub>4</sub>* se caracteriza por ser el más diferenciado, presentando baja afinidad por la mayoría de antagonistas dopaminérgicos, por ejemplo el raclopride y exhibiendo una relativamente alta afinidad por el neuroléptico atípico clozapina. (Missale, et al., 1998).

La diferencia de afinidad que presentan los receptores de dopamina por su ligando endógeno puede permitir la activación de unos receptores o de otros en función de la cantidad de dopamina liberada (Tabla 2). Atendiendo a los diferentes mecanismos de transducción de señal de cada subtipo de receptor, esto genera una gran amplitud de respuestas a una misma sustancia, dependiendo del tipo de proteína G a la que se acople el receptor y las moléculas efectoras que modulan (Tabla 2). Esta diversidad dentro de los receptores de dopamina es un reflejo de la diversidad funcional que ejerce este neurotransmisor, sobre todo si se considera la expresión diferencial de estos receptores dentro del SNC.

La expresión de los distintos subtipos ha sido determinada mediante la combinación de técnicas de unión de radioligandos y de hibridación *in situ*. Así se ha demostrado que el receptor *D<sub>1</sub>* es el más abundante y su

distribución es la más amplia de todos los receptores dopaminérgicos (Dearry, et al., 1990). Se encuentra en diversas regiones del cerebro como estriado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio, hipotálamo y cerebelo, localizándose de manera postsináptica preferencialmente en las neuronas estriatales GABAérgicas que coexpresan sustancia P (Gerfen, et al., 1990). El otro receptor *D<sub>1</sub>-like*, el receptor *D<sub>5</sub>*, presenta una distribución más restringida a regiones como el tálamo o el hipocampo (Vallone, et al., 2000; Centonze, et al., 2003). En cuanto a los receptores *D<sub>2</sub>-like*, el receptor *D<sub>2</sub>* se expresa principalmente en núcleo accumbens, tubérculo olfatorio e hipocampo, tanto pre-sináptica como post-sinápticamente y su expresión es elevada en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Este receptor actúa como autoreceptor en los terminales dopaminérgicos, donde regula la síntesis y liberación de dopamina (Mercuri, et al., 1997). El receptor *D<sub>3</sub>* se localiza específicamente en las regiones límbicas del núcleo accumbens con una localización post-sináptica en neuronas que expresan sustancia P y neurotensina. Por último, el receptor *D<sub>4</sub>* se expresa en interneuronas GABAérgicas tanto piramidales como no-piramidales de la corteza frontal e hipocampo y en el bulbo olfatorio, la amígdala y el mesencéfalo (Missale, et al., 1998).

**Tabla 2. Receptores de dopamina**

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

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

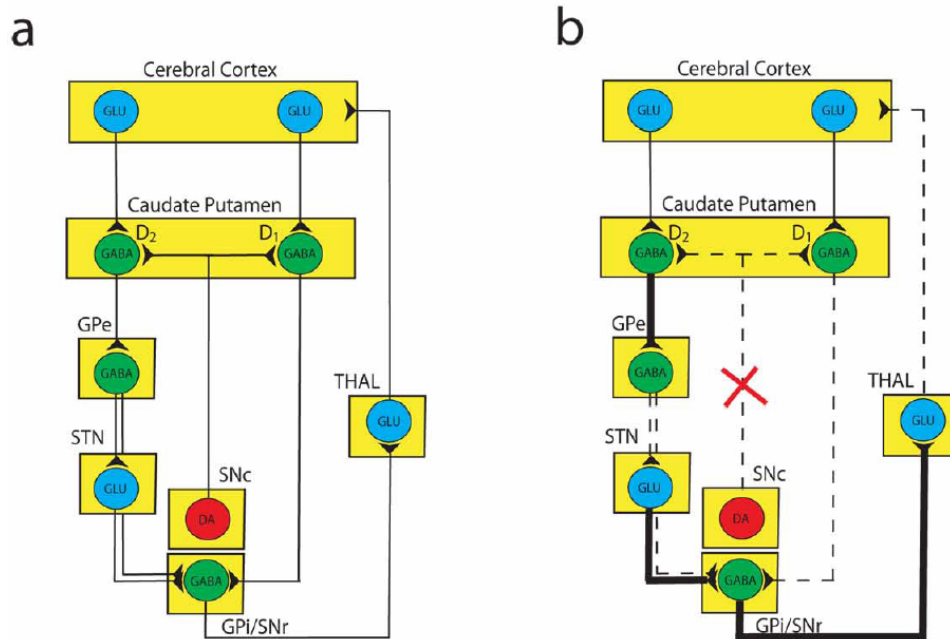
En distintas situaciones patológicas se ha observado la existencia de diferencias cuantitativas en cuanto a la expresión de los receptores de dopamina o bien en su señalización. Por ejemplo, los receptores D<sub>1</sub> se ven incrementados en la esquizofrenia y su señalización varía en la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, la densidad de los receptores D<sub>2</sub> post-sinápticos incrementa en la esquizofrenia y también en los enfermos de Parkinson no tratados con L-DOPA (Reeves, et al., 2009; Matsukawa, et al., 2007).

### 1.3.3 Los ganglios basales

Los ganglios basales están constituidos por cinco núcleos principales en roedores: el estriado, la sustancia nigra, el globus pallidus, el núcleo subtalámico y el núcleo entopeduncular. El estriado es la principal estructura de entrada de los ganglios basales y está funcionalmente subdividido en estriado dorsal y ventral. El estriado dorsal (núcleo caudato y putamen) está implicado en la ejecución y aprendizaje de actos motores complejos. El estriado ventral (núcleo accumbens) forma parte de los circuitos cerebrales implicados en la conversión de la motivación en acción. En el estriado, más del 90% de las neuronas son GABAérgicas de proyección o *medium-size spiny neurons* y reciben dos vías de entrada que convergen en sus espinas dendríticas: por un lado las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, localizadas en la sustancia nigra pars compacta y el área ventral tegmental y por otro lado las neuronas glutamatérgicas procedentes de áreas corticales, límbicas y talámicas (hipocampo y amígdala) (Gerfen, 2004) (Figura 18).

Hay dos subtipos de neuronas GABAérgicas eferentes en el estriado, que proyectan al tálamo a través de dos vías: las neuronas estriatopalidales (vía indirecta) y las neuronas estriatonigroentopedunculares (vía directa). Los dos tipos de neuronas GABAérgicas estriatales se pueden distinguir neuroanatómicamente. Las neuronas estriatopalidales contienen el péptido encefalina y receptores de dopamina, predominantemente del subtipo D<sub>2</sub>. Estas neuronas expresan, también, receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> de adenosina. Las neuronas estriatonigroentopedunculares contienen dinorfina y sustancia P, receptores de dopamina, predominantemente de subtipo D<sub>1</sub> (Alexander y Crutcher, 1990) y receptores A<sub>1</sub> de adenosina, pero no receptores A<sub>2A</sub> (Schiffmann, et al., 2007; Ferré, et al., 2007; Fuxe, et al., 2007). La estimulación de la vía directa produce activación motora, mientras que la de la vía indirecta produce inactivación motora. La vía directa tiende a activar los movimientos voluntarios y la vía indirecta a inhibir la aparición de componentes involuntarios en el movimiento. Un adecuado equilibrio entre las dos produce los movimientos normales. La dopamina

induce la activación de la actividad motora mediante los receptores  $D_1$  de las neuronas estriatonigroentopedunculares, mientras que deprime la actividad de las neuronas estriatopalidales actuando sobre los receptores  $D_2$ , produciendo indirectamente una actividad motora (Alexander y Crutcher, 1990). La dopamina por tanto, estimula el movimiento a través de las dos vías, porque estimula la vía estimuladora e inhibe a la vía inhibitoria (Figura 18a).



**Figura 18. Funcionamiento de los ganglios basales.** Existen dos vías de salida del estriado: la vía directa, que conecta el estriado al núcleo entopeduncular (GPi en humanos)/sustancia nigra pars reticulata (GPi/SNr) y la vía indirecta, que conecta el estriado con el globo pallidus (GP), el núcleo subtalámico (STN) y la sustancia nigra pars reticulata (GPi en humanos)/núcleo entopeduncular (GPi/SNr). a) Estado “normal” y b) Degeneración de la sustancia nigra pars compacta en la enfermedad de Parkinson que hace disminuir la liberación de dopamina en el estriado (Cedido por el Dr. Sergi Ferré).

La enfermedad de Parkinson está producida por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que proyectan de la sustancia nigra, al caudado-putamen. Esto da lugar a una disminución de la liberación de dopamina en el estriado, lo que provoca una hipocividad de las neuronas GABAérgicas estriatonigroentopedunculares (vía directa) y una hiperactividad de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales (vía indirecta) debido a la liberación de los efectos inhibitorios de la dopamina endógena (Obeso, et al., 2008), con el consiguiente descontrol de la actividad de los ganglios basales (Figura 18b). Los síntomas clínicos más relevantes incluyen

bradiquinesia (lentitud en los movimientos), rigidez, temblor en reposo y alteraciones en el equilibrio. El tratamiento paliativo de esta enfermedad es suministrar un precursor de dopamina L-DOPA, que aunque efectivo en los primeros estadios de la enfermedad, acaba por perder la efectividad y provoca la aparición de complicaciones motoras como la discinesia (Nutt, 1990). Actualmente, existen avances importantes en el desarrollo de nuevos fármacos dopaminérgicos y no dopaminérgicos para la enfermedad de Parkinson, así como para las complicaciones motoras de las terapias en uso (Schapira, et al., 2006).

#### 1.3.4 Receptores de cannabinoides

Los efectos de la marihuana se conocen desde el siglo I antes de Cristo, cuando fueron descritos por griegos y romanos. No ha sido hasta más recientemente que se ha descubierto el principio activo de esta planta, el derivado de dibenzopirano  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), que es el principal responsable de los efectos de la marihuana en humanos, como la euforia, relajación (hipolocomoción y catalepsia), taquicardia, vasodilatación, inmunosupresión, aumento del apetito e hipotermia (Ameri, 1999; Piomelli, 2003; Di Marzo, et al., 2004).

Hasta que en 1988, Howlett y colaboradores no describieron uniones de alta afinidad para los cannabinoides en membranas cerebrales (Devane, et al., 1988; Howlett, et al., 1990), la naturaleza lipídica del THC hacía creer erróneamente que su principal efecto tenía lugar por modificación no selectiva de la fluidez de las membranas celulares más que por acción sobre receptores específicos (Lawrence y Gill, 1975). En 1990, mediante *screening* de GPCR huérfanos con varios posibles ligandos, se clonó el primer receptor de esta familia, que se llamó receptor de cannabinoides CB<sub>1</sub> (Matsuda, et al., 1990). El receptor CB<sub>1</sub> es considerado el GPCR más abundante del cerebro de mamíferos. Está presente en varias regiones neuronales, lo que coincide con la variedad de sus efectos. La mayor densidad de receptores CB<sub>1</sub> se detecta en los ganglios basales (Herkenham, et al., 1990), convirtiendo estos receptores en una diana excepcional en el control del movimiento. Estos receptores se localizan principalmente en terminales nerviosos estriatales GABAérgicos y glutamatérgicos, tanto en la zona pre-sináptica, como post-sináptica y extrasináptica (Köfalvi, et al., 2005). También se encuentran en alta densidad en el cerebelo, hipocampo y córtex donde juega un papel importante en fenómenos cognitivos y de memoria. El receptor CB<sub>1</sub> también está presente en el sistema nervioso periférico donde regula la percepción del dolor (Iversen y Chapman, 2002; Beltramo, 2009), funciones cardiovasculares (Randall, et al., 2002; Hiley, 2009), reproductivas (Park, et al., 2004) y gastrointestinales (Di Carlo y Izzo,

2003; Fioramonti y Bueno, 2008). También tiene efectos en la liberación de hormonas y péptidos hipotalámicos y en la regulación de los niveles de hormonas esteroideas, por lo que ejerce una modulación de la ingesta y del eje adrenal-pituitario-hipotalámico (Wenger y Moldrich, 2002).

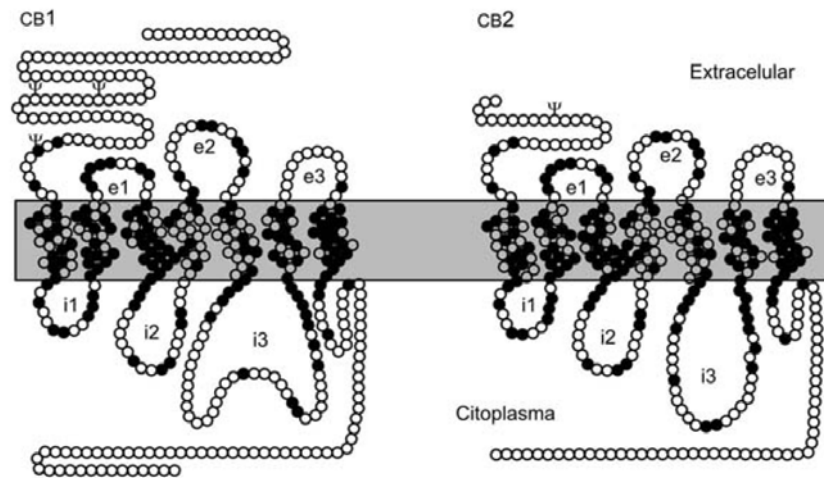
El CB<sub>2</sub> no fue clonado hasta 1993 (Munro, et al., 1993). Este receptor se encuentra básicamente en tejidos y células del sistema inmunitario (Pertwee, et al., 1997), donde juega un papel importante en la inflamación y dolores crónicos (Klein, et al., 2003). Más recientemente, se ha descrito su presencia en células de la glía y microglía (Sánchez, et al., 2001; Walter, et al., 2003; Nuñez, et al., 2004) y hoy en día se acepta que está expresado en neuronas del SNC (Gong et al., 2006; Brusco, et al., 2008).

Se han aportado indicios de la presencia de un tercer receptor de cannabinoides al analizar ciertos efectos de los cannabinoides que no eran mediados por los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>. En estudios con ratones con el receptor CB<sub>1</sub> delecionado (*knock out CB<sub>1</sub>*) se analizó el efecto de los agonistas y antagonistas de estos receptores midiendo la activación de la proteína G. El agonista endógeno, anadamida, y el agonista Win 55212-2 demostraron tener actividad en estos ratones (Breivogel, 2001). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de la existencia de un subtipo de receptor de cannabinoides, que se propuso como variante del receptor CB<sub>1</sub> por *alternative splicing*. Este receptor tendría 61 aminoácidos menos en el extremo amino-terminal del receptor humano o de rata y se denominaría CB<sub>1b</sub> (Shire, et al., 1995). Sin embargo, la evidencia más grande de un nuevo receptor de cannabinoides se ha encontrado en el hipocampo donde, después de delecionar el receptor CB<sub>1</sub>, se postuló que un nuevo receptor cannabinoide mediaba la inhibición de la transmisión sináptica glutamatérgica (Hajos, et al., 2001) Este receptor se propuso como CB<sub>3</sub>. Hoy en día, la existencia de los receptores CB<sub>3</sub> o CB<sub>1b</sub> aún es dudosa hasta que no se aporten nuevas evidencias.

Los receptores de cannabinoides pertenecen a la familia A de los GPCR. Mediante el uso de mutantes delecionados en la cola C-terminal se ha podido determinar que los aminoácidos más próximos a la membrana del extremo carboxi terminal parecen ser críticos para el acoplamiento a la proteína G, mientras que los más distales modulan tanto la amplitud como la cinética de la señal (Nie y Lewis, 2001). La cola C-terminal del receptor CB<sub>1</sub> está implicada, además, en varias funciones como la desensibilización y la internalización. En la figura 19 aparece un esquema de la estructura de los receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.

El descubrimiento de receptores para los cannabinoides provocó la búsqueda de ligandos endógenos que los activaran. Así, el primer ligando identificado fue la anandamida (N-araquidonoiletanolamina) (Devane, et

al., 1992) y posteriormente el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiera, et al., 1995).



**Figura 19. Estructura de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>.** Los círculos negros representan los aminoácidos comunes entre los dos receptores, los círculos vacíos representan los aminoácidos diferentes y los sitios consenso de glicosilación están indicados con el símbolo (ψ). (Extraído de Sagredo, et al., 2005)

La anandamida, del sánscrito *ananda* que significa felicidad, fue el primer endocannabinoide identificado. Es una molécula muy pequeña que al principio se creyó un metabolito producto de la degradación *post-mortem* del cerebro, hasta que estudios posteriores han podido demostrar tanto su síntesis como liberación en terminales nerviosos (Di Marzo, et al., 1994; Giuffrida, et al., 1999; Walker, et al., 1999). El 2-AG se encuentra presente en múltiples vías del metabolismo lipídico, lo que explica que se encuentre en altas concentraciones en el cerebro. Es unas 200 veces más abundante que la anandamida (Sugiura, et al., 1996; Stella, et al., 1997), por lo que parece que su papel podría ser más constitutivo que señalizador. Hasta la fecha se han identificado más endocannabinoides como el noladin eter (Hanus, et al., 2001), la virodhamina (Porter, et al., 2002) o la N-araquidonoildopamina (NADA) (Huang, et al., 2002). El noladin eter es un análogo del 2-AG que se une y activa a los receptores CB<sub>1</sub>, su biosíntesis no ha sido caracterizada y su papel en cerebros normales parece cuestionada (Oka, et al., 2003). La virodhamina parece ser que actúa como antagonista endógeno del receptor CB<sub>1</sub> y aunque su presencia en cerebro ha sido documentada (Porter, et al., 2002), es químicamente inestable convirtiéndose en anandamida en ambientes acuosos. Finalmente la NADA es un agonista

endógeno de receptores vanilloides que presenta afinidad por los receptores de cannabinoides *in vitro*.

Todos los ligandos endógenos identificados de los receptores de cannabinoides son de naturaleza lipídica y su biosíntesis tiene lugar a partir de ciertos fosfolípidos presentes en la membrana de las neuronas y células gliales (Bisogno, et al., 2003; Okamoto, et al., 2004). Los enzimas responsables de la síntesis de los endocannabinoides se encuentran en la misma membrana y están estimulados por altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas dos observaciones indican que estos compuestos no se almacenan en vesículas de secreción, si no que son biosintetizados y liberados al medio extracelular donde y cuando se necesitan. Pese a que su naturaleza lipídica les permite difundir por la membrana, existen evidencias como: la saturación del sistema, la relación alta, la dependencia de la temperatura y la selectividad de sustrato, que inducen a pensar que existen transportadores, tanto para su liberación como recaptación. Sin embargo, no han podido ser identificados (Beltramo, et al., 1997; Hillard, et al., 1997) y continúan siendo materia de estudio (Yates y Baker, 2009).

La anandamida y el 2-AG son sintetizados y localizados dentro de la célula en compartimentos diferentes. Además, la existencia de diferentes rutas para la síntesis de anandamida y 2-AG sugiere que estos dos endocannabinoides pueden operar de forma independiente el uno del otro. A parte de la síntesis, la degradación de ambas sustancias está mediada por enzimas diferentes, localizados también de forma diferente, lo que sugiere, de nuevo, diferentes funciones para estos dos compuestos (Chevaleyre y Castillo, 2003). La FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*), es el enzima responsable de eliminar la anandamida y se encuentra anclada a las membranas intracelulares (Cravatt, et al., 1996) con una localización principalmente post-sináptica (Egertova, et al., 2003), mientras que la MAGL (*MonoAcilGlicerol Lipase*) degrada al 2-AG y se localiza en las neuronas de forma presináptica (Dinh, et al., 2002).

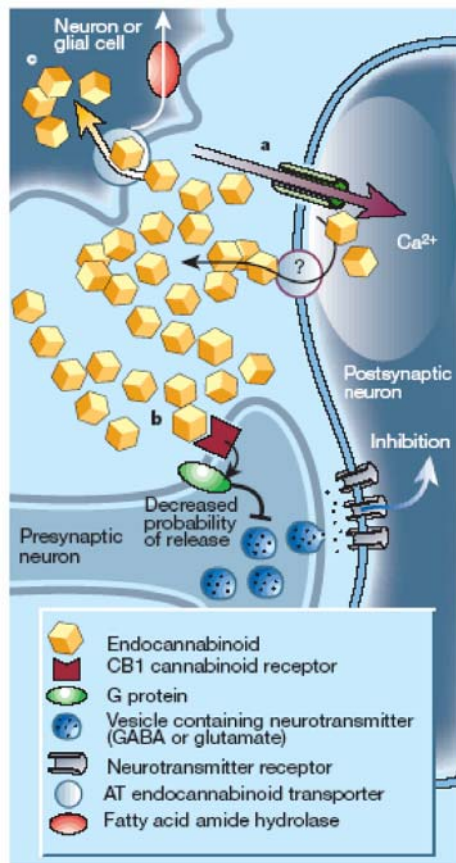
La principal vía de señalización de los receptores de cannabinoides es a través del acoplamiento a proteínas  $G_{i/o}$ . Ello conlleva la inhibición de la adenilato ciclasa con la correspondiente falta de fosforilación de los sustratos de la PKA como el canal de  $\text{K}^+$ , que al no ser fosforilado permite la salida de  $\text{K}^+$ .

La activación de los receptores de cannabinoides también estimula la vía de las MAPK mediante un mecanismo dependiente de activación de proteína G y de niveles bajos de AMPc (Derkinderen, et al., 1996; 2003). De esta manera la estimulación del receptor permite, entre otras cosas, regular la expresión génica. También se ha propuesto la activación de



complejas cascadas de fosforilación como las que implican a la fosfoinositol-3-kinasa y PKB (McAllister y Glass, 2002; Piomelli, 2003).

En el caso de la activación de los receptores CB<sub>1</sub>, pero no los receptores CB<sub>2</sub>, también está descrito una inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje y la estimulación de canales rectificadores de entrada de K<sup>+</sup> (McAllister y Glass, 2002).



**Figura 20. Acción pre-sináptica de los CB<sub>1</sub>R en la inhibición de la liberación de neurotransmisores.** (Extraído de Christie y Vaughan, 2001)

El mecanismo principal de la acción de los cannabinoides es como mensajeros retrógrados. Los endocannabinoides son liberados por neuronas post-sinápticas despolarizadas, ya que en estas células la despolarización da lugar a la entrada de Ca<sup>2+</sup>, que es un activador de los enzimas responsables de la biosíntesis de los endocannabinoides. Estos son liberados y difunden hacia la neurona pre-sináptica donde interactúan con el receptor CB<sub>1</sub>.

La acción principal de la activación del receptor es la inhibición de la liberación de neurotransmisores, tanto por la activación de canales de K<sup>+</sup> como por la inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup>, que es la señal que dispara la fusión en la membrana de las vesículas que contienen a los neurotransmisores (Figura 20).

Aunque la acción principal de los receptores CB<sub>1</sub> tiene lugar a nivel presináptico, también se han encontrado receptores CB<sub>1</sub> a nivel postsináptico y extrasináptico, donde la activación del receptor disminuye el potencial de acción (Köfalvi, et al., 2005).

Los cannabinoides ejercen modulación de la función motora (Howlett, et al., 1990), y por tanto, tienen un elevado potencial terapéutico en enfermedades como el Parkinson y la enfermedad de Huntington (Brotchie, 2003; Lastres-Becker, et al., 2003; Van der Stelt y Di Marzo,

2003). Además, también se ha descrito que una hiperactividad permanente del sistema endocannabinoide puede contribuir al desarrollo de síntomas en el Parkinson y el Alzheimer, como la inhibición de la actividad motora y la pérdida de memoria, respectivamente (Mazzola, et al., 2003). La esclerosis múltiple también es una enfermedad que puede resultar en una permanente hiperactividad del sistema endocannabinoide.

#### **1.4 INTERRELACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D<sub>2</sub>, ADENOSINA A<sub>2A</sub> Y CANNABINOIDES CB<sub>1</sub> EN EL ESTRIADO**

Los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides codistribuyen en el estriado y colocalizan en neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Puesto que el estriado es el mayor componente de los ganglios basales implicado en las funciones motoras, cognitivas y límbicas (Calabresi, et al., 1997; Packard y Knowlton, 2002), ha suscitado un enorme interés estudiar si la adenosina y los endocannabinoides pueden modular la transmisión dopaminérgica. De hecho, las alteraciones en las vías dopaminérgicas estriatales están implicadas en una gran variedad de desórdenes neurológicos y psiquiátricos como el Parkinson, el síndrome de Tourette, la esquizofrenia y la adicción a drogas (Berke y Hyman, 2000; Carlsson, et al., 2001; Steeves y Fox, 2008).

##### **1.4.1 Interacción molecular y funcional entre receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y de dopamina D<sub>2</sub>**

La adenosina y la dopamina ejercen efectos opuestos en el estriado. La primera indicación de una interacción antagónica entre los receptores de adenosina y de dopamina se obtuvo al analizar el comportamiento de animales modelo de la enfermedad de Parkinson (Fuxe y Ungerstedt, 1974). Se utilizaron los antagonistas no selectivos de adenosina, cafeína y teofilina, en combinación con L-DOPA y agonistas de los receptores de dopamina y se observó un aumento de la actividad motora producida por los fármacos dopaminérgicos.

En estudios posteriores se describió que los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> presentes en el estriado mediaban los efectos de depresión motora de los agonistas adenosinérgicos y los efectos de estimulación motora de los antagonistas de los receptores de adenosina (Ferré, et al., 1992; Ferré, et al., 1997).

La mayoría de los receptores de adenosina del estriado se encuentran en las neuronas eferentes GABAérgicas (Rivkees, et al., 1995; Schiffmann, et al., 1991). Tanto las neuronas estriatopalidales como las neuronas

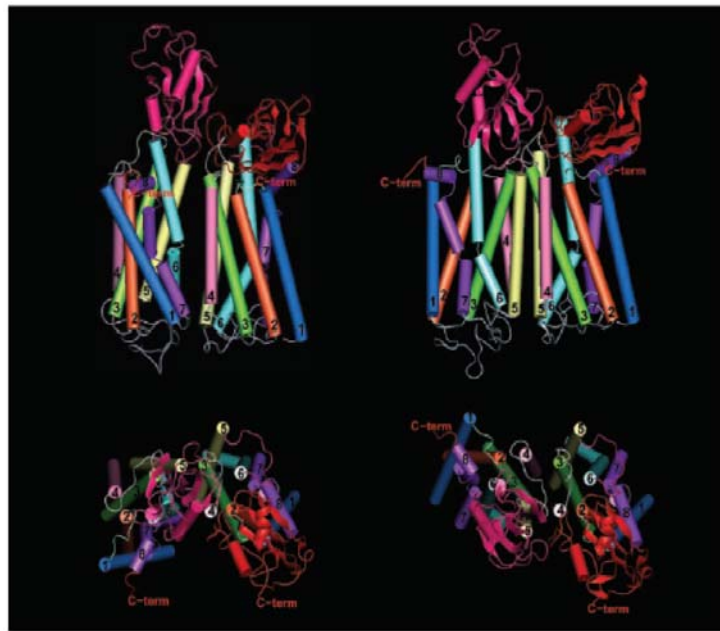
estriatonigroentopedunculares contienen receptor  $A_1$ , mientras que el receptor  $A_{2A}$  está localizado únicamente en las neuronas estriatopalidales de la vía indirecta (Ferré, et al., 1997; Schiffmann, et al., 1991). Como resultado de estas localizaciones anatómicas, existe una codistribución específica entre el receptor  $A_{2A}$  y el receptor de dopamina  $D_2$ , mientras que el receptor  $A_1$  puede codistribuir tanto con el receptor  $D_2$  como con el receptor  $D_1$ . Concretamente, los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  se localizan en las dendritas de las neuronas GABAérgicas estriatopalidales en una proporción del 69-81%, aunque también pueden codistribuir en los terminales axónicos de estas neuronas (18-28%) (Rosin, et al., 1998).

Las interacciones antagónicas entre el receptor  $A_{2A}$  y el receptor  $D_2$  han sido demostradas a nivel bioquímico, funcional y de comportamiento. Existen numerosas evidencias de la interacción funcional antagónica entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$ . Por ejemplo, en preparaciones de membrana de estriado de rata, la activación de los receptores  $A_{2A}$  disminuye la afinidad de los receptores  $D_2$  por sus agonistas, además de su señalización (Ferré, et al., 1991). Por otra parte, la activación de los receptores  $D_2$  antagonizan la señalización mediada por los receptores  $A_{2A}$  a través de proteína  $G_{olf}$  (Kull, et al., 1999). Estos efectos pueden ser explicados parcialmente por un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros, pero también sugieren la interacción molecular entre ambos receptores. Sin embargo, no fue hasta 2002 cuando se sugirió por estudios de coimmunoprecipitación y colocalización la existencia de los complejos heteroméricos  $A_{2A}$ - $D_2$  en membranas celulares, tanto de células transfectadas como de cultivos primarios de neuronas estriatales (Hillion, et al., 2001). Es remarcable señalar que la exposición prolongada a los agonistas de los receptores  $A_{2A}$  o  $D_2$  resulta en una coagregación, una cointernalización y una codesensibilización de ambos receptores (Hillion, et al., 2002).

La confirmación definitiva de la presencia de heterómeros  $A_{2A}$ - $D_2$  se llevó a cabo en nuestro grupo mediante experimentos de BRET y FRET en células *in vivo* (Canals, et al., 2003) y fue posteriormente corroborado por otros laboratorios (Kamiya, et al., 2003). Canals y colaboradores, mediante el uso de técnicas computacionales y de un mutante del receptor  $D_2$  (una construcción quimérica  $D_2$ - $D_1$ ) establecieron algunos determinantes estructurales implicados en la dimerización de estas proteínas (Figura 21).

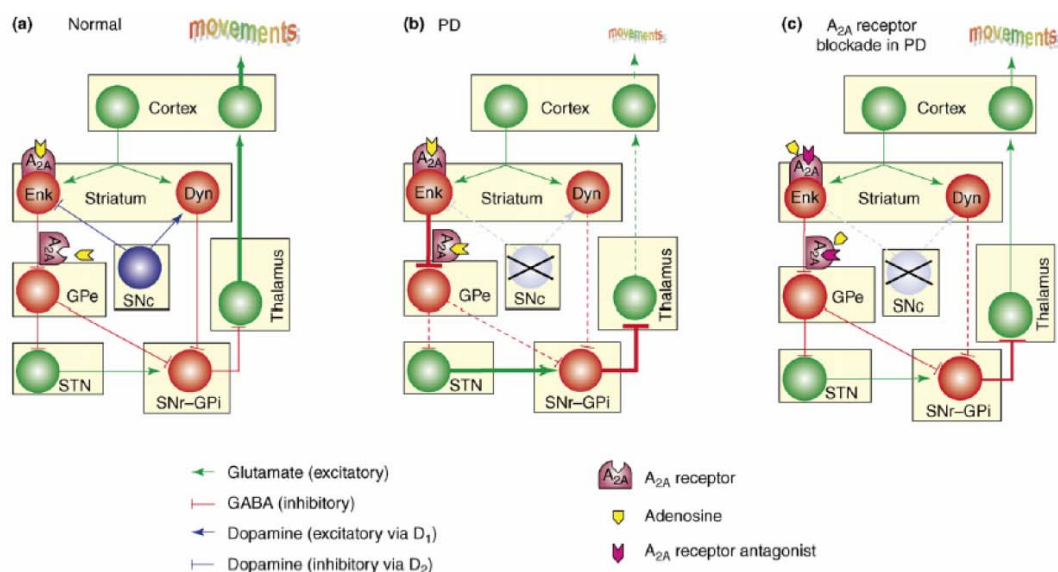
En la formación de complejos  $A_{2A}$ - $D_2$  parecen ser importantes los dominios transmembrana 5 y 6 y el bucle intracelular 3 del receptor  $D_2$  que interaccionan con el transmembrana 4 y el dominio C-terminal del receptor  $A_{2A}$ . Posteriormente se han obtenido evidencias de que las interacciones electrostáticas entre dos regiones de residuos básicos del

bucle intracelular 3 del receptor  $D_2$  con ciertos residuos ácidos de la parte más distal de la cola C-terminal del receptor  $A_{2A}$  pueden ser determinantes para la formación del heterodímero (Ciruela, et al., 2004). Pese a que la exposición prolongada a agonistas de ambos receptores da lugar a una coagregación, observada por técnicas de inmunocitoquímica, el tratamiento con ligandos de estos receptores, de forma individual o conjunta, no altera el grado de dimerización. Lo que sugiere que estos heterómeros se preforman en el RE (Canals, et al., 2003).



**Figura 21. Modelos del heterodímero  $A_{2A}$ - $D_2$ .** En las imágenes superiores, las hélices están paralelas a la membrana plasmática y los dominios intracelulares del receptor están situados arriba. En las imágenes inferiores, la visión de las hélices es des de la parte intracelular. (Extraído de Canals, et al., 2003)

La heterodimerización  $A_{2A}$ - $D_2$  tiene una gran relevancia en la enfermedad de Parkinson. Los antagonistas de los receptores  $A_{2A}$  bloquean la acción de la adenosina endógena sobre el heterómero  $A_{2A}$ - $D_2$ , provocando un incremento en la señalización mediada por el receptor  $D_2$ , además de disminuir la señalización inducida por la adenosina endógena (Ferré, et al., 1991;Fuxe, et al., 2005;Fuxe, et al., 2007b;Ferré, et al., 2008) (Figura 22). Así pues, el tratamiento combinado de L-DOPA y antagonistas de adenosina parece potenciar las acciones antiparkinsonianas de la L-DOPA, tanto en modelos animales (Kanda, et al., 1998, 2000) como en pacientes de esta enfermedad (Bara-Jimenez, et al., 2003;Hauser, et al., 2003).



**Figura 22. Mecanismo propuesto de la actividad anti-parkinsoniana de los antagonistas del receptor A<sub>2A</sub> en humanos.** a) Estado “normal”. b) Degeneración de la sustancia nigra pars compacta (SNc) en la enfermedad de Parkinson. c) Acción de los antagonistas del A<sub>2A</sub>R. (SNr-Gpi: equivalente al núcleo entopeduncular en rata. Gpe: estriado-globus pallidus pars externa. STN: núcleo subtalámico).

#### 1.4.2 Interacción molecular y funcional entre receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y de dopamina D<sub>2</sub>

La dopamina y los endocannabinoides presentan complejas interacciones en los ganglios basales. Por ejemplo, la estimulación del estriado con cannabinoides incrementa la síntesis y liberación de dopamina (Romero et al., 1995; Szabo, et al., 1998). A la vez, la estimulación de los receptores D<sub>2</sub> estriatales de rata desencadena *in vivo* la liberación de anandamida (Giuffrida, et al., 1999).

El receptor CB<sub>1</sub> se expresa de forma abundante en el estriado, tanto en las proyecciones de la neuronas GABAérgicas estriatonigroentopedunculares como estriatopalidales (Herkenham, et al., 1991) además de en las interneuronas GABAérgicas que controlan a estas neuronas de proyección. El receptor D<sub>2</sub> se expresa principalmente en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales, por lo que es en este tipo neuronal donde puede tener lugar una interacción entre estos dos receptores. En estas neuronas la colocalización es básicamente a nivel de dendritas, aunque también en pequeños terminales axónicos (Ferré, et al., 1997). También hay coexpresión de los receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en las terminaciones glutamatérgicas corticoestriatales, una de las vías de entrada al estriado. En estas sinapsis glutamatérgicas la activación de receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> disminuye la liberación del neurotransmisor

glutamato (Yin y Lovinger, 2006; Bamford, et al., 2004), mediando la plasticidad sináptica por LTD, lo que parece ser importante tanto para el control motor como para el aprendizaje (Jog, et al., 1999). Una evidencia clara de que ambas proteínas pueden interactuar molecularmente es el hecho de que de forma individual ambos receptores inhiben la estimulación de la AC (Meschler y Howlett, 2001), sin embargo, la activación conjunta o simplemente la coexpresión de ambos receptores en cultivos de neuronas estriatales cambia el acoplamiento de la proteína  $G_{i/o}$  a la proteína  $G_s$  (Jarrahian, et al., 2004).

En el 2005, Kearn sugirió la existencia de los heterodímeros  $D_2$ - $CB_1$  mediante experimentos de coimmunoprecipitación (Kearn, et al., 2005). En este estudio se observó que en ausencia de agonistas, ambos receptores coimmunoprecipitaban, pero que los agonistas del receptor  $CB_1$  tendían a incrementar la coimmunoprecipitación entre estos dos receptores, mientras que los antagonistas de este mismo receptor tendían a disminuirla. Además, en estos experimentos se observó un comportamiento similar al observado con la estimulación de la AC, pero a nivel de la activación de la vía de las MAPKs. La coexpresión de ambos receptores incrementa de forma considerable la fosforilación de ERK 1/2 mediada por activación de  $CB_1R$ , pero no de  $D_2R$ , comparado con la señal obtenida mediante la expresión de uno de los receptores. El incremento observado en la señal mediada por el receptor  $CB_1$  en células que coexpresan ambos receptores, es independiente del tratamiento con la toxina pertusis (a diferencia de lo que ocurre cuando la estimulación de la vía es en células transfectadas con un único receptor), por lo que se puede concluir que la coexpresión de los receptores  $CB_1$  y  $D_2$  da lugar a un acoplamiento del complejo a la proteína  $G_s$  en vez de a la proteína  $G_{i/o}$ . Finalmente observan que cada receptor presenta una afinidad similar por un antagonista radiomarcado tanto si se expresa de forma individual como conjunta, además de no observar cambios en la afinidad de uno de los receptores cuando se estimula al otro, por lo que sugieren que la formación de los dímeros  $D_2$ - $CB_1$  no altera los centros de unión a ligando (Kearn, et al., 2005).

#### **1.4.3 Interacción molecular y funcional entre receptores de adenosina $A_{2A}$ y de cannabinoides $CB_1$**

Los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  codistribuyen en varias áreas del SNC, como el estriado, cerebelo, hipocampo y córtex (Herkenham, et al., 1991; Svenningsson, et al., 1999). Además, la adenosina y los cannabinoides participan en la modulación de diferentes procesos como la nocicepción, ansiedad, agresividad, actividad motora y adicción a las drogas (Fredholm y Svenningsson, 2003; Piomelli, 2003). Sin embargo, es

poco lo que se ha publicado sobre la interacción funcional entre estos receptores.

En las vías relacionadas con la drogadicción, la transmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico juega un papel crucial en la modulación de los procesos de recompensa (Koob, 1996; Di Chiara, 2002) y por lo tanto, en las propiedades adictivas de las drogas de abuso. La adenosina regula la transmisión dopaminérgica a través de interacciones antagónicas entre los receptores  $A_1/D_1$  y  $A_{2A}/D_2$  (Franco, et al., 2000; Canals, et al., 2003). Los cannabinoides, a través de su receptor  $CB_1$ , también controlan esta vía mediante interacciones con el receptor  $D_2$  (Kearn, et al., 2005). Así pues, ambos receptores pueden tener un papel relevante en fenómenos de adicción de drogas. De hecho, está descrito que la administración crónica de elevadas dosis de cannabinoides como el THC y el HU-210 producen dependencia física en animales de experimentación (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002) y que la adenosina juega un papel crucial en los fenómenos de dependencia física y abstinencia de diferentes drogas de abuso.

Mediante el uso de ratones *Knock Out (KO)* se ha demostrado que los ratones que tienen deleciónado el gen para el receptor  $A_{2A}$  presentan un síndrome de abstinencia a opiodes mayor que los WT (Berrendero, et al., 2003), mientras que los signos de abstinencia a opiodes en el *KO* de  $CB_1$  son menores (Ledent, et al., 1999). Por lo tanto, los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  tienen un papel opuesto en la expresión de la dependencia a opiodes (Berrendero, et al., 2003). Por otro lado, también está descrito que las manifestaciones somáticas de abstinencia a THC inducidas tras la administración del agonista inverso del  $CB_1R$ , SR 141716A, están atenuadas en el *KO* de  $A_{2A}R$ , además de que este ratón modificado presenta una reducción importante en los efectos de recompensa inducidos por THC (Soria, et al., 2004).

Respecto al control del movimiento, está descrito que el doble *KO* para los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  presenta una actividad espontánea reducida, además de niveles más altos de ansiedad (Berrendero, et al., 2003). Como se ha comentado, ambos receptores participan en el control del movimiento en el estriado. En este sentido, varios estudios sugieren el potencial terapéutico de drogas que actúen sobre estos dos receptores en el tratamiento de patologías motoras como el Parkinson.

Sin embargo, no fue hasta el 2007 cuando se demostró que los efectos motores de los cannabinoides dependían de interacciones físicas y funcionales entre los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  (Carriba, et al., 2007). Mediante la técnica de BRET se pudo demostrar la formación de heterómeros entre ambos receptores en cultivos celulares. Además, en cultivos de neuroblastomas humanos se observó que el bloqueo del

receptor  $A_{2A}$  inducía la disminución de los efectos de depresión motora producidos por el agonista del receptor  $CB_1$  (Carriba, et al., 2007).

#### 1.4.4 Interacción funcional entre receptores $A_{2A}$ de adenosina, $D_2$ de dopamina y $CB_1$ de cannabinoides

Las drogas de abuso producen diferentes respuestas clínicas, sin embargo las caracteriza su capacidad de provocar adicción. Esto sugiere que comparten un mecanismo molecular en común que contribuye al desarrollo de la adicción. Los incrementos de dopamina extracelular en el núcleo accumbens (Robbins y Everitt, 1999) y la señalización mediada por PKA (Nestler, 2001) se consideran implicados en todos los fenómenos de adicción.

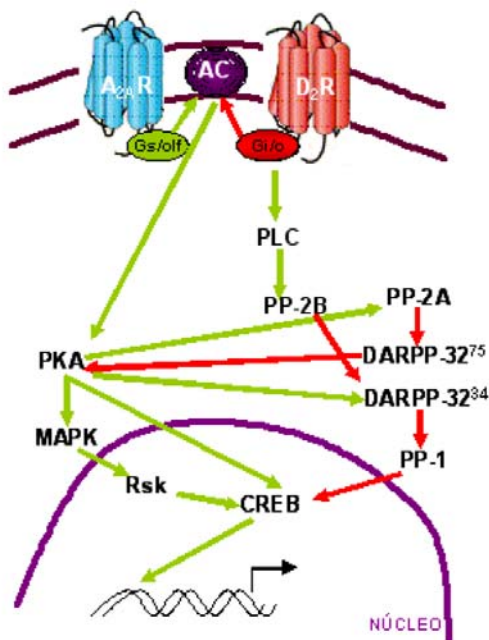
En las neuronas de proyección estriatales está altamente expresada la proteína DARPP-32 (*Dopamine and cyclic Adenosine 3',5'monophosphate Regulated Phospho Protein*, 32 kDa) (Walaas y Greengard, 1984) que actúa como modulador de la vía de AMPc. La fosforilación catalizada por la PKA en la Thr34 convierte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

Las neuronas estriatopalidales coexpresan los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y de dopamina  $D_2$ . En estas células el estado de fosforilación de la proteína DARPP-32 en Thr34 es consecuencia de un balance entre la activación de los receptores  $A_{2A}$ , que estimulan la activación de la PKA por incremento de los niveles de AMPc y la activación de los receptores  $D_2$  que reducen la actividad de la PKA por inhibición de la producción de AMPc y por activación de la fosfatasa PP-2B que desfosforila a DARPP-32 (Figura 23). Se ha descrito que el incremento en la fosforilación de la posición Thr34 de la DARPP-32 producido por el bloqueo de los receptores  $D_2$ , es dependiente de la acción de la adenosina a través de  $A_{2A}R$  (Svenningsson, et al., 2000), sugiriendo que la inhibición de la fosforilación de DARPP-32 ejercida por  $D_2R$  está mediada principalmente por la inhibición de la producción de AMPc.

Considerando que la cascada de señalización del receptor  $CB_1$  es similar a la del receptor  $D_2$  (disminución de la producción de AMPc) cabría pensar que los agonistas de receptores  $CB_1$  producen una inhibición de la fosforilación de la Thr34 de DARPP-32. Sin embargo, la activación de



CB<sub>1</sub>, mediante agonista o por inhibición de la recaptación de cannabinoides, produce una marcada reducción de la actividad motora relacionada con la estimulación de la fosforilación en la Thr34 de la DARPP-32 (Andersson, et al., 2005). La disminución motora provocada por la activación de receptores CB<sub>1</sub> se ve atenuada por la inactivación genética de DARPP-32. La mutación puntual de la DARPP-32 en la posición Thr34, lugar que fosforila la PKA, produce una reducción similar de la actividad motora a la producida por el agonista del receptor CB<sub>1</sub>, CP-55,940. Por otro lado, la inactivación genética de los receptores D<sub>2</sub> o A<sub>2A</sub> disminuye tanto la fosforilación de DARPP-32 en la Thr34, como la acción de inhibición motora provocada por el CP-55,940 (Andersson, et al., 2005). Según estos autores la activación de receptores CB<sub>1</sub> incrementa la fosforilación en la Thr34 por antagonización de la inhibición ejercida por el receptor D<sub>2</sub> en la cascada AMPc/PKA. Considerando las interacciones opuestas entre los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>, y el hecho de que los efectos del CP-55,940 son menores al tratar con antagonistas del receptor A<sub>2A</sub> y en el *KO* de este receptor, se confirma la idea de que el receptor CB<sub>1</sub> actúa contrarrestando la transmisión a través del receptor de dopamina D<sub>2</sub>. Este *cross-talk* negativo de mecanismo desconocido, daría lugar a una desinhibición/facilitación de la activación AMPc/PKA/DARPP-32 dependiente del receptor A<sub>2A</sub> en la vía indirecta de salida del estriado.



**Figura 23. Relación antagónica entre A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> en la fosforilación de la proteína DARPP-32.** Las flechas verdes representan activación y las rojas inhibición.

En contraposición, los resultados de Yao están a favor de un *cross-talk* positivo entre receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub> y de dopamina D<sub>2</sub>. Estos autores observan que concentraciones subóptimas de agonistas de CB<sub>1</sub> y agonistas de D<sub>2</sub>, que por separado no tienen ningún efecto, activan la

señal cAMP/PKA de forma sinérgica (Yao, et al., 2003). Esta sinergia está corroborada por el hecho de que los agonistas de receptores D<sub>2</sub> potencian la sedación inducida por cannabinoides a dosis que son inefectivas cuando se administran solas (Meschler, et al., 2000). Para que esta sinergia tenga lugar se requiere de la activación de receptores A<sub>2A</sub> por adenosina, así mismo, antagonistas de este receptor pueden atenuar el desarrollo de fenómenos adictivos. La sinergia entre receptores CB<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> (modulada por receptores A<sub>2A</sub>) parece conferir hipersensibilidad a cannabinoides además de incrementar la sensibilidad del receptor D<sub>2</sub> cuando estos tres receptores están expresados en la misma neurona. Por lo tanto, este *cross-talk* puede ser importante en la activación inducida por drogas en las neuronas de proyección que se originan en el núcleo acumbens (Yao, et al., 2003).

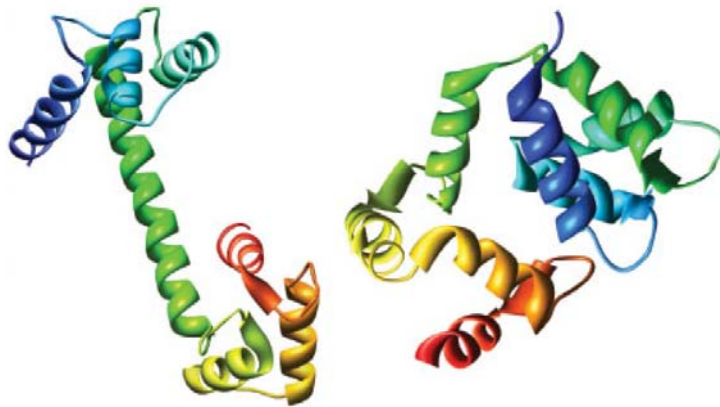
### 1.5 INTERACCIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL ENTRE RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>2A</sub>, DE DOPAMINA D<sub>2</sub> Y LA CALMODULINA

La calmodulina (CaM) es una proteína de unión de calcio altamente conservada que se expresa en todas las células eucariotas. Puede unirse a un gran número de proteínas y modular gran variedad de funciones en la célula. La CaM interviene en procesos como el metabolismo, la apoptosis, la inflamación, la contracción muscular, la memoria a corto y largo plazo, el desarrollo del sistema nervioso y la respuesta inmune. Se encuentra en distintos tipos de células y se localiza en diferentes partes de la célula, como son la membrana plasmática, los orgánulos celulares o el citoplasma.

La CaM se une a diversas proteínas que son incapaces de unir calcio, ejerciendo una función de sensor o de transductor de señal. Tanto el calcio citoplasmático como las reservas del retículo endoplasmático o sarcoplasmático pueden ser utilizados por la calmodulina. Esta proteína puede unir hasta cuatro iones de calcio, sufriendo cambios conformacionales con cada nueva unión (Figura 24). Estos cambios conformacionales le permiten unirse de forma específica con diferentes proteínas (enzimas, canales iónicos, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto) y realizar gran variedad de acciones específicas.

En los últimos años se ha descrito que también es capaz de interactuar con distintos receptores acoplados a proteína G. Entre ellos, se encuentra la interacción de la calmodulina con el receptor metabotrópico 5 de glutamato. Este receptor contiene un lugar de unión a la calmodulina en la cola C-terminal del receptor, que coincide con el lugar de unión de la

subunidad G $\beta\gamma$  de la proteína G (El Far, et al., 2001). Wang y colaboradores, describieron la interacción de esta proteína con el tercer bucle intracelular del receptor  $\mu$ -opioide (Wang, et al., 1999). Se concluyó que la calmodulina reducía la interacción del receptor  $\mu$ -opioide con la proteína G, probablemente mediante un mecanismo de competencia (Zhang, et al., 2005).



**Figura 24. Esquema de la estructura de la calmodulina.** En la izquierda se observa la conformación de unión a cuatro iones de Ca<sup>2+</sup> y a la derecha la conformación libre de Ca<sup>2+</sup>. (Extraído de Cornell Engineering Magazine)

Más adelante, Turner y colaboradores demostraron mediante estudios de coimmunoprecipitación y la técnica bioluminiscente de BRET en células vivas, la interacción de la CaM con el receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> (Turner, et al., 2004). De forma similar se describió la interacción de la calmodulina con la región N-terminal del tercer bucle intracelular del receptor D<sub>2</sub> de dopamina en una zona comprometida en la interacción entre el receptor y la proteína G (Bofill-Cardona, et al., 2000). Posteriormente se confirmó que era el tercer bucle intracelular el implicado en la interacción del receptor D<sub>2</sub> de dopamina con la calmodulina y se demostró que la activación del receptor por agonistas incrementaba la colocalización del receptor con la calmodulina endógena en células HEK 293 y en cultivos primarios de neuronas (Liu, et al., 2007). Los mismos autores describieron un dominio constituido por tres aminoácidos, en el tercer bucle intracelular del receptor, necesario para la interacción con la calmodulina. La mutación de estos aminoácidos reduce la interacción con la calmodulina y disminuye, también, la activación de la vía de las MAPK y los niveles de AMPc inducidos por agonistas del receptor, sin modificar la afinidad por los ligandos. Lo que sugiere que la unión de calmodulina puede modular la señalización del receptor (Liu, et al., 2007). Finalmente, no fue hasta el 2008 que se encontró *in vitro* un epítipo del extremo C-terminal del receptor A<sub>2A</sub> de adenosina que era capaz de interactuar con la CaM y se sugirió que era responsable de la interacción de dicho receptor con la CaM (Woods, et al., 2008). En este estudio también se analizó que la región de interacción

del receptor D<sub>2</sub> de dopamina con la calmodulina coincidía con la región de interacción de este receptor en el heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>. Todos estos resultados muestran una fuerte implicación de la calmodulina con los GPCR y sugieren una gran relevancia de esta proteína en el papel funcional de estos receptores que aún se desconoce.

## 1.6 RELACIÓN ENTRE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA Y LOS EFECTOS DE LA COCAINA

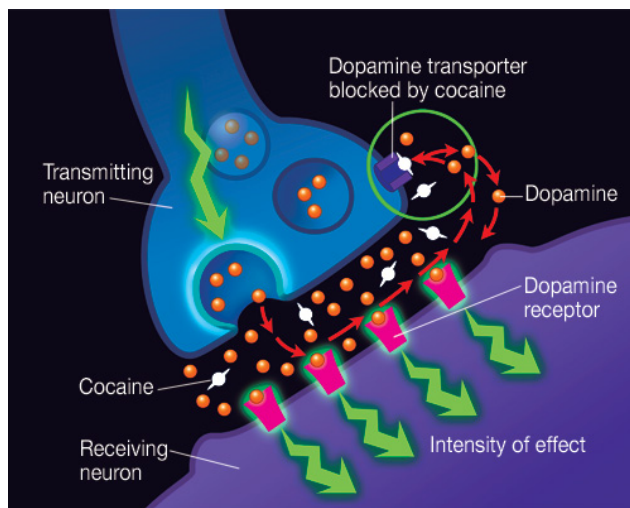
La cocaína es un extracto purificado de la planta de coca, *Erythroxylum coca*, procedente originariamente de América del sur. Las hojas de coca han formado parte de las culturas Inca, Ayamara y Quechua durante siglos. Para conseguir los efectos estimulantes, de euforia y eliminación del apetito, las hojas de coca eran masticadas. Originariamente, la coca era administrada, exclusivamente, en forma de hoja hasta que en 1860, Albert Neiman aisló un extracto de la hoja de coca, la cocaína. Su utilización se extendió rápidamente por todo el mundo y hoy en día su posesión, cultivo y distribución son ilegales, exceptuando requisitos médicos o normas gubernamentales; sin embargo, su uso está ampliamente extendido. Actualmente, la adicción a cocaína es un problema social y resulta complicado encontrar un buen tratamiento debido al alto grado de recaída que presenta el consumo de esta sustancia.

Hasta el momento, se sabe que la cocaína interacciona con el transportador de dopamina (DAT) presináptico, aunque es mucho lo que falta por descubrir sobre los efectos neurobiológicos de esta sustancia. Desde hace tiempo existen evidencias de que diferentes drogas de abuso (cocaína, nicotina o morfina) provocan cambios neurobiológicos (Koob, 1992; Pich, et al., 1997; Piccotto, 1998). La identificación de las moléculas biológicas implicadas en la adicción a la cocaína resultaría un gran avance en la búsqueda de una terapia para el abuso de esta sustancia.

Se conoce desde antiguo que la cocaína actúa inhibiendo la recaptación de monoaminas como la dopamina (Moore, 1977; Heikkila, et al., 1979, Ritz, et al., 1987), norepinefrina (Moore, 1977) y serotonina (Ross y Renyi, 1967). Sin embargo, aunque la cocaína actúa con el mismo grado de efecto en los tres transportadores, la mayoría de los efectos en el comportamiento (De Wit y Wise, 1977; Colpaert, et al., 1978; Miczek, et al., 1982) y la actividad motora (Giros, et al., 1996) de esta sustancia se atribuyen al bloqueo de la recaptación de dopamina. Una vez administrada, la cocaína muestra una acción rápida aumentando los niveles de dopamina en el espacio sináptico, lo que causa una

sobreestimulación de las vías dopaminérgicas (Figura 25). Los picos de dopamina pueden aparecer a los cinco minutos y no recuperarse los niveles basales hasta los treinta minutos (Bradberry, 2000). Además, la vida media de la cocaína en rata es corta, puede oscilar entre quince minutos y una hora dependiendo de la vía de administración utilizada (Nayak, et al., 1976) y se cree que una administración repetitiva podría prolongar los altos niveles de dopamina en el espacio sináptico y la vida media de esta sustancia (Volkow, et al., 1999). Se considera que la hidrólisis del éster de cocaína es la principal ruta de su catatabolismo.

Analizando los efectos de la cocaína desde una perspectiva morfológica, Roberts y colaboradores describieron una inhibición en los efectos de recompensa de la cocaína en ratas con el núcleo acumbens lesionado (Roberts, et al., 1977). Más adelante, en estudios de ratas adictas a la cocaína, se escogió el córtex prefrontal como región implicada en la autoadministración de microinyecciones de cocaína (Goeders y Smith, 1983). Por otro lado las vías nigroestriatales controlan gran variedad de funciones motoras, además de contener la concentración más elevada de neuronas dopaminérgicas. Estos datos convierten al córtex prefrontal y las vías nigroestriatales en las regiones más importantes en la integración de los efectos de la cocaína, aunque no son las únicas (Bardo, et al., 1998).



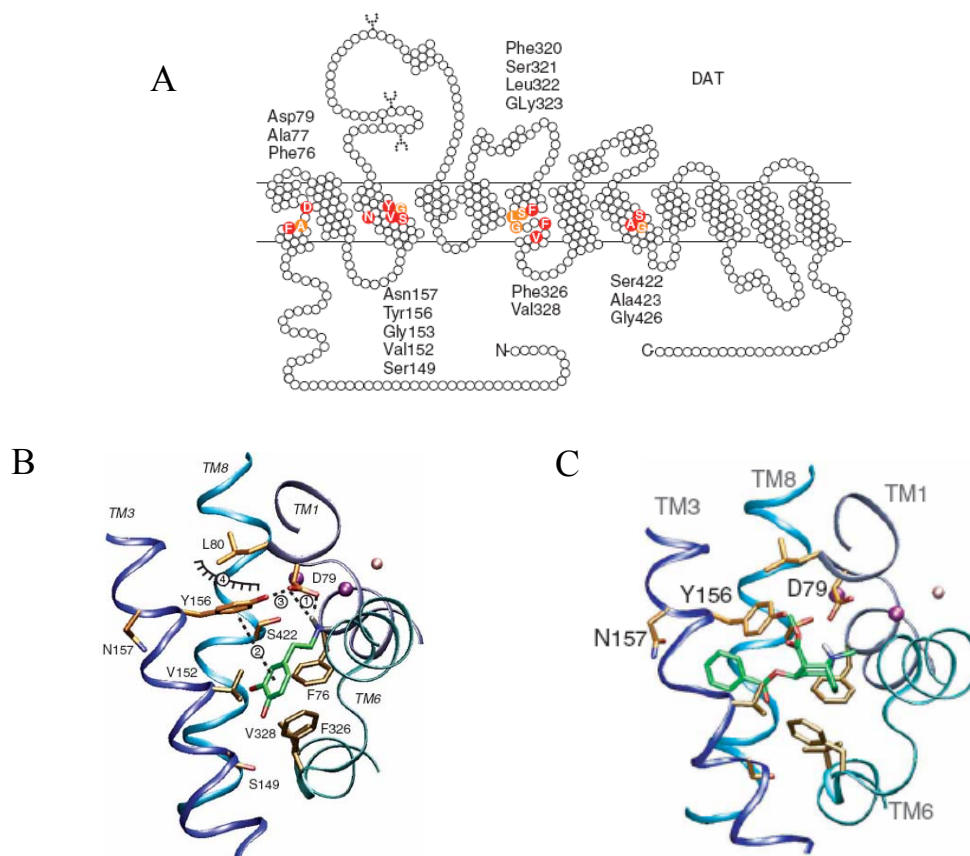
**Figura 25. Efecto del bloqueo de los transportadores de dopamina (DAT) por la cocaína.** (Extraído del artículo Stimulant Addiction del Nacional Institute on Drug Abuse (NIDA))

Un hipotético mecanismo de los cambios de comportamiento consecuentes a la administración crónica de cocaína es una alteración de la plasticidad sináptica del cerebro. Hasta el momento, han sido descritos diferentes cambios en la estructura de las dendritas (Robinson y Kolb, 1999; Robinson, et al., 2001). Estos cambios podrían ser debidos a alteraciones en la expresión de las proteínas de los neurofilamentos, las proteínas del citoesqueleto y/o las “*gap junctions*”, todas ellas muy

importantes para la estabilidad y la buena integración de los receptores en la sinapsis neuronal.

### 1.6.1 Proteínas de unión de la cocaína

La cocaína ejerce sus funciones por interacción con proteínas específicas. Como hemos comentado anteriormente, la proteína más reconocida que puede unir cocaína es el transportador de dopamina DAT. Se ha estudiado molecularmente la interacción de la cocaína con DAT. Mediante el modelaje molecular de DAT basado en la estructura cristalina de Aquifex aeolicus LeuT(Aa), un transportador de leucina homólogo en bacterias (Ravna, et al., 2009), se ha postulado que la unión de la cocaína a DAT ocurre en un dominio de unión análogo al lugar de unión de la leucina en el transportador LeuT(Aa).



**Figura 26. Esquema de la interacción de la cocaína y la dopamina con DAT.** A) Representación del transportador de dopamina, DAT. Los círculos pintados corresponden a los lugares donde coincide la interacción de DAT con la dopamina y la cocaína. B) Esquema de la interacción de DAT con la dopamina. C) Esquema de la interacción de DAT con la cocaína. (Extraído de Bertolino, et al., 2009)

En el centro de interacción de la cocaína con DAT intervienen las hélices transmembrana 1, 3, 6 y 8 del transportador. Este centro de unión se

superpone con el sitio de unión de la dopamina y las anfetaminas, pero es claramente diferente del lugar de unión de distintos antidepresivos (Beuming, et al., 2008). Este hecho explica el bloqueo de la unión de la dopamina a DAT inducido por la cocaína (Figura 26) y, consecuentemente, el incremento en los niveles de dopamina en el espacio extracelular.

Mediante estudios *in vitro* (Bertolino, et al., 2009) e *in vivo* (Meiergerd, et al., 1993; Dickinson, et al., 1999; Mortensen y Amara, 2003), se ha podido demostrar que existe una relación directa entre DAT y el receptor D<sub>2</sub> de dopamina ya que ambos se regulan de forma recíproca a nivel presináptico. Bertolino y colaboradores han demostrado que se produce una interacción molecular entre DAT y los receptores D<sub>2</sub> (Bertolino, et al., 2009). Esta interacción puede ser fundamental para entender como la señalización de la dopamina se ve claramente regulada, a nivel presináptico, por DAT y por el receptor de dopamina D<sub>2</sub> en el estriado y en el córtex prefrontal.

Además de DAT, la cocaína puede interactuar con otras proteínas. Hoy en día es un hecho aceptado que la cocaína interactúa con los receptores sigma a concentraciones fisiológicas (Mesangeau et al., 2008). Esta familia de proteínas esta formada por los receptores sigma-1 y sigma-2. La estructura del receptor sigma-2 aún no se conoce. Por otro lado, la estructura de sigma-1 es muy distinta de cualquier otra proteína conocida de mamíferos. Muestra un 66% de homología con una esterol isomerasa fúngica, careciendo sin embargo de su actividad enzimática. Se caracteriza por tres regiones altamente hidrofóbicas que formarían dos segmentos transmembrana con los extremos amino y carboxi terminales intracelulares (figura 27).



**Figura 27. Esquema de la estructura del receptor sigma-1.** (Extraído de Steve Beyer's blog, 2009)

El receptor sigma-1 es una chaperona que modula las señales dependientes de calcio y se localiza principalmente en el retículo endoplasmático de la célula, aunque también se encuentra en la membrana plasmática, nuclear y mitocondrial (Alonso, et al., 2000). Se

encuentra ampliamente distribuido por todo el SNC y la periferia. En 1976 fue clasificado como receptor opioide debido a su capacidad de interacción con N-allylnormetazocine, sustancia que no se unía a los receptores  $\kappa$ - y  $\mu$ -opioides (Martin, et al., 1976); sin embargo, la acción de los ligandos de sigma-1 no era bloqueada por los antagonistas opioides, naloxona y naltrexona, y fue considerado como receptor huérfano no opioide. El receptor sigma interacciona con diferentes sustancias, además de la cocaína, entre las que destacan el haloperidol o los esteroides como la progesterona (Hayashi, et al., 2003).

Muy recientemente se ha encontrado un alucinógeno endógeno que interacciona con el receptor sigma-1, el DMT (*N,N*-dimethyltryptamine). Esta sustancia actuaría como agonista endógeno del receptor inhibiendo los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje en los miocitos (Fontanilla, et al., 2009). El receptor sigma-1 también está implicado en la modulación de la liberación de calcio, la modulación de la contracción cardiaca y la inhibición de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (Monassier, et al., 2002). En 2001 Hayashi describió la interacción del receptor sigma-1 con los receptores  $\text{IP}_3$  en el retículo endoplasmático (Hayashi, et al., 2001). Más adelante, se demostró que la activación del receptor sigma-1 mediante sus agonistas (PRE-084 o carbetapentane) fosforila la subunidad NR1 del receptor NMDA vía PKC y PKA aumentando su expresión y reforzando la inducción de dolor a través del receptor NMDA. Esta señal se veía reducida por el tratamiento con el antagonista específico del receptor sigma-1 (Kim, et al., 2008). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna interacción de estos receptores con ningún GPCR, aunque existen numerosas evidencias de la amplificación de señales de GPCR mediante los receptores sigma-1. Actualmente son considerados como receptores auxiliares o amplificadores de otras señales.

El receptor sigma-1 se encuentra estrechamente relacionado con la acción de la cocaína en diferentes aspectos, como son la hiperlocomoción (Menkel, et al., 1991), la sensibilización (Ujike, et al., 1996), el mecanismo de recompensa (Romieu, et al., 2000;2002), las convulsiones y la letalidad (Matsumoto, et al., 2001), aunque se desconoce el mecanismo de acción de todos ellos. Estudios recientes han descrito que una reducción del receptor sigma-1 en cerebro, mediante oligonucleótidos *anti-sense*, disminuye las acciones convulsivas y locomotoras estimulantes de la cocaína (Matsumoto, et al., 2001,2002). Por otro lado, antagonistas sintéticos del receptor sigma-1 han disminuido las acciones de la cocaína en modelos animales (Matsumoto, et al., 2003). La función del subtipo sigma-1 se encuentra claramente unida a las acciones de la cocaína (Mesangeau, et al., 2008). A pesar de que recientemente han aparecido estudios que también involucran el receptor sigma-2 con las



acciones de la cocaína (Matsumoto, et al., 2007), su papel aún no está definido debido a la falta de ligandos completamente selectivos para este subtipo. Para añadir complejidad, el receptor sigma-2 aún no ha sido clonado.

Por otro lado, la cocaína es la droga de abuso más estudiada con referencia a su interacción con los receptores sigma-1 (Hayashi and Su, 2005). Una de las razones es que la cocaína posee una afinidad moderada por sigma-1 en ensayos de unión de radioligando (Matsumoto, et al., 2003; Sharkey, et al., 1988). Matsumoto y colaboradores describieron que los antagonistas del receptor sigma inhiben de forma significativa las convulsiones y letalidad inducidas por dosis tóxicas de cocaína (Matsumoto, et al., 2002; 2004). La toxicidad de la cocaína se ve potenciada con los agonistas del receptor sigma-1 (Matsumoto, et al., 2002; 2004). Este descubrimiento indica que las acciones de la cocaína, al menos en parte, pueden ser mediadas por su unión al receptor sigma-1. La cocaína es un psicoestimulante que, al bloquear la recaptación de dopamina, produce la sobreactivación de los receptores post-sinápticos de dopamina (Kalivas, 2004). Así, los efectos de los ligandos del receptor sigma-1 en la conducta inducida por cocaína se ha creído que podrían ser debidos a la interferencia en la señalización de los receptores de dopamina (Romieu, et al., 2000, 2002).

### **1.6.2 Efectos de la cocaína mediados por los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>**

A pesar de que se ha visto que la administración crónica de cocaína induce cambios en la expresión génica de muchos receptores como el receptor metabotrópico 5 de glutamato (mGluR5) (Ghasemzadeh, et al., 1999) o el receptor  $\mu$ -opioid (Yuferov, et al., 1999), estudios en humanos postmortem no indicaron ningún cambio en el mRNA de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> o D<sub>2</sub> en individuos adictos a la cocaína con referencia a los controles (Little, et al., 1993). Estos resultados han sido controvertidos ya que se ha demostrado una disminución de la expresión de los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> de dopamina en individuos adictos a la cocaína en comparación con individuos sanos mediante la técnica PET (*positron emission tomography*) (Martínez, et al., 2009). La variación de la expresión de receptores de dopamina inducida por cocaína puede variar mucho según la especie y la región del cerebro, ya que en ratas, después de cuatro semanas de autoadministración de cocaína, se observó un incremento del mRNA del receptor D<sub>1</sub> en el cerebro anterior y un incremento del mRNA de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el sistema límbico (Laurier, et al., 1994).

A parte de la modificación o no de la expresión de los receptores, la cocaína induce un incremento de la liberación de dopamina y una sobreestimulación de las vías dopaminérgicas (Anderson y Pierce, 2005; De Mei, et al., 2009). Mediante el fuerte aumento de la transmisión dopaminérgica en el estriado, la cocaína induce los efectos de recompensa así como la aparición de nuevos estímulos (Volkow, et al., 2003; Zink, et al., 2003). Los receptores D<sub>2</sub> están involucrados en la mediación de estos efectos. Los agonistas del receptor D<sub>2</sub> reducen la autoadministración de cocaína, mientras los antagonistas incrementan este comportamiento. Estos resultados sugieren que el receptor D<sub>2</sub> actúe por un mecanismo *feed-back* para disminuir la autoadministración de cocaína (Corrigall y Coen, 1991; Caine, et al., 1999).

Los antagonistas glutamatérgicos y dopaminérgicos reducen la activación de la transcripción génica inducida por la cocaína (Konradi, 1998; Valjent, et al., 2005). La activación de los receptores de dopamina D<sub>1</sub> es un requerimiento imprescindible para la respuesta celular y conductual inducida por la cocaína tal como se demuestra en estudios realizados con ratones *KO* para el receptor D<sub>1</sub> (Xu, et al., 1994). Estudios recientes utilizando ratones transgénicos, donde las células que expresan los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se encuentran marcadas mediante proteínas fluorescentes, han confirmado estos datos, mostrando que la respuesta celular aguda inducida por la cocaína involucra principalmente las neuronas que expresan los receptores D<sub>1</sub> de dopamina (Bertrán-González, et al., 2008). En este escenario cabría esperar que una inhibición de la expresión génica del receptor D<sub>2S</sub> amplificaría los efectos de la cocaína *in vivo*, debido a la inhibición ejercida por el receptor D<sub>2S</sub> de la liberación de dopamina. Sin embargo, no son estos efectos los que se observan. El efecto de la cocaína en ratones *KO* para receptores D<sub>2</sub> ha sido estudiado tanto en tratamientos agudos, crónicos como en autoadministración de cocaína, con el resultado que los ratones *KO* para D<sub>2</sub> tienen alteradas las respuestas a cocaína. Así, la estimulación de la actividad motora inducida por cocaína en los ratones *KO* para receptores D<sub>2</sub> no incrementa de forma dosis-dependiente (Welter, et al., 2007; Chausmer, et al., 2002). De forma sorprendente, la administración de cocaína en los ratones *KO* para D<sub>2</sub> no induce la expresión de *c-fos* (Centonze, et al., 2002). Esto conduce a hipotetizar que en ausencia del receptor D<sub>2</sub>, aparece un circuito inhibitorio, normalmente controlado por los receptores D<sub>2</sub>, provocando la supresión de la inducción de *c-fos*. En este contexto, el GABA y la acetilcolina pueden aumentar de forma considerable debido a la pérdida del control de su liberación por el receptor D<sub>2</sub> y jugar un papel en el bloqueo de la inducción de *c-fos* (Centonze, et al., 2002). De forma alternativa, la pérdida de los receptores D<sub>2</sub> afecta la formación de complejos macromoleculares entre

los receptores  $D_2$  y otras proteínas que normalmente controlan la respuesta celular y conductual de la cocaína (Liu, et al., 2006).

Los efectos de recompensa de la cocaína en los ratones *KO* para receptores  $D_2$  se ven atenuados (Welter, et al., 2007). Sin embargo, estudios de autoadministración de cocaína en ratones *KO* para  $D_2R$  demostraron que los ratones *KO* se autoadministraban más cocaína que los ratones WT (Caine, et al., 2002). No puede excluirse la contribución de otros neuromoduladores (como por ejemplo la noradrenalina o la serotonina) y se requiere un análisis más profundo para esclarecer este fenómeno. Este punto es importante debido a la existencia de numerosos estudios que muestran una pérdida de los efectos de recompensa de diferentes drogas de abuso en ratones *KO* para  $D_2R$  (Elmer, et al., 2005; Risinger, et al., 2000).

Por otro lado, los ratones *KO* para  $D_{2L}$ , que por lo tanto siguen expresando los autoreceptores  $D_{2S}$ , mantienen la respuesta locomotora y de recompensa a la cocaína parecida a los animales WT (Usiello, et al., 2000; Wang, et al., 2000; Rouge-Pont, et al., 2002). Así, parece ser que el receptor  $D_{2S}$  es el principal implicado en la respuesta celular y conductual de las drogas de abuso. Esto sugiere que los efectos presinápticos de los receptores  $D_2$  no involucran únicamente la liberación de dopamina, sino también de GABA, glutamato y acetilcolina en respuesta a las drogas de abuso. Así, existe una diferente implicación de las isoformas  $D_{2S}$  y  $D_{2L}$  en la señalización dopaminérgica inducida por drogas de abuso. La ausencia de la señalización del receptor  $D_{2L}$  no altera los efectos motores y de recompensa inducidos por la cocaína. Contrariamente, la señalización del receptor  $D_{2S}$  parece ser un requisito imprescindible para los efectos motores y de recompensa de la cocaína y otras drogas de abuso. De todos modos, se requieren más estudios para poder decidir que componente presináptico se encuentra involucrado en estas respuestas y si se encuentra en las neuronas dopaminérgicas o las neuronas postsinápticas.



## **OBJETIVOS**



Clásicamente, los receptores acoplados a proteína G se consideraban unidades individuales capaces de producir una señal intracelular. En la actualidad se acepta que estas proteínas pueden interaccionar con otros receptores de siete dominios transmembrana formando homo- y heterodímeros y que sus interacciones pueden dar lugar a nuevas propiedades farmacológicas de los receptores involucrados. El grupo de investigación en el cual se ha desarrollado esta Tesis doctoral ha sido pionero en el descubrimiento de interacciones moleculares entre dos miembros de esta familia de receptores. Se ha identificado la interacción molecular y funcional entre los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y A<sub>2A</sub> de adenosina, los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides y los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides. Si bien se disponía de técnicas capaces de detectar homo- y heterodímeros, resultaba cada vez más necesario el desarrollo de técnicas que permitieran determinar la formación de oligómeros de más de dos receptores para establecer las propiedades de las redes moleculares que controlan la comunicación intracelular. Con estos precedentes, el primer y segundo objetivos de esta tesis han sido:

**Objetivo 1. Desarrollar técnicas basadas en la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente y fluorescente que permitan determinar la existencia de la interacción molecular entre más de dos proteínas distintas.**

**Objetivo 2. Investigar la formación de heterotrímeros entre los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, CB<sub>1</sub> de cannabinoides y D<sub>2</sub> de dopamina en el estriado utilizando estas nuevas técnicas.**

La característica más notoria de los heterómeros de GPCR es que la funcionalidad de los receptores no es la misma si se encuentran expresados individualmente o formando heterómeros. Este cambio de funcionalidad por heteromerización tiene una importante repercusión en la búsqueda de nuevas terapias para las diversas enfermedades donde estos heterómeros puedan verse involucrados. Sin embargo, las bases estructurales implicadas en este cambio de funcionalidad son totalmente desconocidas, principalmente por que se conoce muy poco la estructura cuaternaria de los homo- y heterómeros. Con el fin de investigar la estructura cuaternaria de los heterotrímeros de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina-CB<sub>1</sub> de cannabinoides-D<sub>2</sub> de dopamina se ha propuesto el tercer objetivo de esta Tesis:

**Objetivo 3. Investigar la participación de interacciones electrostáticas entre dominios intracelulares del heterotrímero de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina-CB<sub>1</sub> de cannabinoides-D<sub>2</sub> de dopamina y analizar la relevancia de estas interacciones en la funcionalidad del heterómero.**

La heteromerización de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina-D<sub>2</sub> de dopamina tiene fuertes implicaciones en el funcionamiento de los ganglios basales. Se conoce que el Ca<sup>+2</sup> es un segundo mensajero implicado en la regulación de la transmisión dopaminérgica en los ganglios basales. Se ha descrito que la modulación por Ca<sup>+2</sup> de los receptores D<sub>2</sub> de dopamina está mediada por la interacción de la proteína calmodulina con los receptores D<sub>2</sub>. También se ha descrito que los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> presentan un dominio de interacción con la calmodulina. Sin embargo, se desconocía totalmente si la calmodulina era capaz de interactuar con el heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> y si el Ca<sup>+2</sup> podía modular esta interacción. En este contexto, el cuarto objetivo de esta Tesis ha sido:

**Objetivo 4. Determinar si la calmodulina interacciona con los heterómeros de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina-D<sub>2</sub> de dopamina e investigar el papel del Ca<sup>+2</sup> en esta interacción.**

Las vías dopaminérgicas y especialmente la señalización mediada por el receptor D<sub>1</sub> de dopamina, están profundamente implicadas en la adicción a cocaína. Una gran parte de los efectos mediados por la cocaína se atribuyen a una sobre-estimulación de la señalización de los receptores de dopamina debida al incremento de dopamina ocasionado por la inhibición por cocaína del transportador de dopamina (DAT). Sin embargo, la cocaína, además de interactuar con DAT, puede unirse a otras proteínas como los receptores sigma-1, aunque se desconoce totalmente si estos receptores pueden modular la funcionalidad de los receptores de dopamina. Dentro de este marco se han propuesto los objetivos 5 y 6 de esta tesis:

**Objetivo 5. Identificar cambios en la farmacología y expresión de los receptores de dopamina y adenosina en un modelo animal de adicción a la cocaína.**

**Objetivo 6. Investigar si existe alguna relación entre los receptores D<sub>1</sub> de dopamina y los receptores sigma-1 como proteínas de unión de cocaína.**



## **RESULTADOS**



Carme Lluís Biset y Enric I. Canela Campos  
Grupo de Neurobiología Molecular  
Dep. de Bioquímica y Biología Molecular  
Av. Diagonal, 645  
Edificio Nuevo, Planta-2  
08028 Barcelona

La tesis doctoral de Gemma Navarro Brugal “Interrelaciones moleculares y funcionales entre receptores de dopamina, cannabinoides y adenosina en el estriado” se presenta como un compendio de publicaciones.

El manuscrito “**Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET**” ha sido publicado en *Nature Methods* con un factor de impacto de 13.7. El manuscrito “**Detection of heteromers formed by cannabinoid CB<sub>1</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> G protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer**” ha sido publicado en *The Scientific World Journal* con un factor de impacto de 1.8. El manuscrito “**Electrostatic interactions as key determinants of the quaternary structure of receptor heteromers**” ha sido enviado para su publicación a *Nature Chemical Biology*, con un factor de impacto de 14.6, y en este momento está siendo considerado por los evaluadores. El manuscrito “**Interactions between calmodulin, adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors**” ha sido publicado en *Journal of Biological Chemistry* con un factor de impacto de 5.5. El manuscrito “**Increase in A<sub>2A</sub> receptors in the nucleus accumbens alter extended cocaine self-administration and its disappearance alter cocaine withdrawal**” ha sido publicado en *Brain Research* con un factor de impacto de 2.5. Finalmente, el manuscrito “**Cocaine binding to sigma-1 receptors in the dopamine D<sub>1</sub>-sigma-1 receptor heteromer modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function**” está en vías de preparación para ser enviado a *Journal Neurosciences* con un factor de impacto de 7.5.

En el trabajo “**Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET**” la Dra. Paulina Carriba empezó la puesta a punto de la técnica de SRET y su aplicación a la detección de heterómeros formados por tres receptores de membrana. Debido a la finalización de su tesis doctoral, la doctoranda Gemma Navarro llevó a cabo todos los experimentos conducentes a la validación de la técnica utilizando proteínas G heterotriméricas y obtuvo las proteínas de fusión correspondientes a los controles positivos. Así mismo, ha efectuado todos los experimentos correspondientes a la técnica de SRET<sup>1</sup>. En el trabajo “**Detection of heteromers formed by cannabinoid CB<sub>1</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> G protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer**”, exceptuando la obtención de alguna de las proteínas de fusión, la doctoranda Gemma Navarro ha realizado la totalidad del trabajo experimental. En el trabajo “**Interactions between calmodulin, adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub>**

**receptors**”, exceptuando los experimentos de inmunoprecipitación y proteómica, la doctoranda Gemma Navarro ha realizado la totalidad del trabajo experimental. En el trabajo “**Electrostatic interactions as key determinants of the quaternary structure of receptor heteromers**”, exceptuando el modelaje molecular, los ensayos de espectrometría de masas y los experimentos realizados con muestras de ratones, el resto del trabajo experimental ha sido llevado a cabo por la doctoranda Gemma Navarro. En el trabajo “**Increase in A<sub>2A</sub> receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal**” la doctoranda Gemma Navarro ha analizado la expresión de los receptores en los diferentes tejidos mediante el uso de la técnica de Western blot. Finalmente, en el trabajo “**Cocaine binding to sigma-1 receptors in the dopamine D<sub>1</sub>-sigma-1 receptor heteromer modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function**” exceptuando los experimentos de determinación de AMPc y los experimentos de señalización efectuados con muestras de ratones, la doctoranda Gemma Navarro ha llevado a cabo la totalidad del trabajo experimental.

La Dra. Paulina Carriba ha utilizado la primera versión del manuscrito “**Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET**” para la elaboración de su tesis doctoral. Y el Dr. Daniel Marcellino ha utilizado el manuscrito “**Increase in A<sub>2A</sub> receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal**” para la elaboración de su tesis doctoral.

Barcelona, a 18 de enero de 2010

Dra. Carme Lluís Biset

Dr. Enric I. Canela Campos

Los resultados de la presente Tesis están reflejados en los siguientes manuscritos:

3.1 Paulina Carriba\*, **Gemma Navarro\***, Francisco Ciruela, Sergi Ferré, Vicent Casadó, Luigi Agnati, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Kjell Fuxe, Enric I Canela, Carme Lluís i Rafael Franco. **Detección de la heteromerización entre más de dos proteínas mediante BRET-FRET secuencial (SRET).**

Manuscrito publicado en *Nature Methods*.

3.2 **Gemma Navarro**, Paulina Carriba, Jorge Gandía, Francisco Ciruela, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Carme Lluís y Rafael Franco. **Detección de heterómeros formados por receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub>, dopamina D<sub>2</sub> y adenosina A<sub>2A</sub> mediante la combinación de las técnicas de fluorescencia por complementación bimolecular y transferencia de energía de resonancia bioluminiscente.**

Manuscrito publicado en *The Scientific World Journal*.

3.3 **Gemma Navarro**, Sergi Ferré, Arnau Cordomi, Estefanía Moreno, Josefa Mallol, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Hanne Hoffmann, Jordi Ortiz, Enric I. Canela, Carme Lluís, Leonardo Pardo, Rafael Franco y Amina S. Woods. **Relevancia de las interacciones electrostáticas en la formación de la estructura cuaternaria de heterómeros de receptores.**

Manuscrito enviado.

3.4 **Gemma Navarro**, María S. Aymerich, Daniel Marcellino, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Luigi Agnati, Amina S. Woods, Kjell Fuxe, Carme Lluís, José Luís Lanciego, Sergi Ferré y Rafael Franco. **Interacciones entre la calmodulina y los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y dopamina D<sub>2</sub>.**

Manuscrito publicado en *Journal of Biological Chemistry*.

3.5 Daniel Marcellino, David C. Roberts, **Gemma Navarro**, M. Filip, Carmen Lluís, Rafael Franco y Kjell Fuxe. **La autoadministración de cocaína por periodos largos incrementa la expresión de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina en el núcleo accumbens que revierte durante los periodos de abstinencia.**

Manuscrito publicado en *Brain Research*.

**3.6 Gemma Navarro, Estefanía Moreno, Marisol Aymerich, Daniel Marcellino, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Enric I. Canela, Jordi Ortiz, Kjell Fuxe, Carmen Lluís, Sergi Ferré, y Rafael Franco. La unión de la cocaína al receptor sigma-1 en el heterómero de receptores D<sub>1</sub>-sigma-1 modula la función del receptor D<sub>1</sub> de dopamina.**

Manuscrito en preparación para ser enviado.

### 3.1 Detección de la heteromerización entre más de dos proteínas mediante BRET-FRET secuencial (SRET)

Paulina Carriba\*, Gemma Navarro\*, Francisco Ciruela, Sergi Ferré, Vicent Casadó, Luigi Agnati, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Kjell Fuxe, Enric I Canela, Carme Lluís i Rafael Franco

\* Coautores del manuscrito

Manuscrito publicado en *Nature Methods* 2008 Aug;5(8):727-33.

La identificación de oligómeros formados por varios protómeros en la membrana plasmática es esencial para decodificar las propiedades de las redes moleculares que controlan la comunicación intercelular. En este estudio se combinan las técnicas de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) y FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) en una nueva técnica denominada SRET (*sequential BRET-FRET*), que permite la identificación de heterómeros formados por tres proteínas diferentes. En el SRET, la oxidación del sustrato de la *Renilla luciferase (Rluc)* por una proteína fusionada a *Rluc* activa la excitación de una segunda proteína de fusión mediante BRET y posteriormente de una tercera proteína de fusión, mediante FRET. Se describen dos variaciones de la técnica de SRET que se basan en el uso de diferentes sustratos para la proteína *Rluc* y una apropiada pareja de proteínas fluorescentes aceptoras. Con la técnica de SRET se han identificado heterómeros de receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub>, de dopamina D<sub>2</sub> y de adenosina A<sub>2A</sub> en células vivas. El SRET es una técnica muy valiosa para identificar complejos heteroméricos de más de dos receptores de neurotransmisores, que va a permitir entender mejor la integración de las señales a nivel molecular.





### 3.2 Detección de heterómeros formados por receptores de cannabinoides CB<sub>1</sub>, dopamina D<sub>2</sub> y adenosina A<sub>2A</sub> mediante la combinación de las técnicas de fluorescencia por complementación bimolecular y transferencia de energía de resonancia bioluminiscente

Gemma Navarro, Paulina Carriba, Jorge Gandía, Francisco Ciruela, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Carme Lluís y Rafael Franco

Manuscrito publicado en *The Scientific World Journal* 2008 Oct 11;8:1088-97.

Considerando la señalización intracelular, se han descrito interacciones funcionales entre los receptores de dopamina (D<sub>2</sub>) y de cannabinoides (CB<sub>1</sub>), entre los receptores de cannabinoides (CB<sub>1</sub>) y de adenosina (A<sub>2A</sub>) y entre los receptores de dopamina (D<sub>2</sub>) y de adenosina (A<sub>2A</sub>). Además, se han descrito interacciones moleculares directas entre las parejas de receptores CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>. En este estudio se ha desarrollado la combinación de las técnicas de BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) y BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*) para identificar hetero-oligómeros de los receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> en células vivas.



### 3.3 Relevancia de las interacciones electrostáticas en la formación de la estructura cuaternaria de heterómeros de receptores

Gemma Navarro, Sergi Ferré, Arnau Cordomi, Estefanía Moreno, Josefa Mallol, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Hanne Hoffmann, Jordi Ortiz, Enric I. Canela, Carme Lluís, Leonardo Pardo, Rafael Franco y Amina S. Woods

Manuscrito enviado para su publicación. El manuscrito está siendo revisado por los evaluadores.

Los heterómeros de receptores acoplados a proteína G (GPCR) son complejos macromoleculares con características funcionales propias, diferentes de las de los receptores individuales. Se sabe muy poco sobre la estructura cuaternaria de los heterómeros de GPCR, responsable de las características funcionales propias de estos complejos. En este estudio, mediante el uso de técnicas de transferencia de energía resonante (RET) en experimentos con receptores mutados, se muestra, por primera vez, una clara evidencia del papel de las interacciones electrostáticas en la formación de la estructura cuaternaria de los heterómeros entre los receptores  $A_{2A}$  de adenosina,  $D_2$  de dopamina y  $CB_1$  de cannabinoides. En estos heterómeros, se forman puentes salinos entre epítomos ricos en argininas y residuos de serina o treonina fosforilados en dominios consenso de fosforilación por CK1/2. Cada receptor ( $A_{2A}$ ,  $D_2$  y  $CB_1$ ) contiene dos dominios intracelulares altamente conservados para establecer interacciones electrostáticas selectivas con dominios intracelulares de los otros dos receptores. Ello indica que estas interacciones electrostáticas en particular constituyen un mecanismo general en la heteromerización entre receptores. Los mismos dominios intracelulares involucrados en la heterodimerización de los receptores  $A_{2A}$ - $D_2$ ,  $A_{2A}$ - $CB_1$  y  $CB_1$ - $D_2$  se encuentran también involucrados en la heteromultimerización de los receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$ . La mutación de estos dominios conduce a una alteración de la estructura cuaternaria y, lo que es más importante, a un cambio en la función del heteromultímero de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$  (cambio en la señalización vía MAPK), que permite su identificación en tejido de cerebro de roedor. Estos resultados nos permiten proponer el primer modelo de estructura cuaternaria de heteromultímeros de receptores.



## **Electrostatic Interactions as Key Determinants of the Quaternary Structure of Receptor Heteromers**

**Gemma Navarro<sup>1</sup>, Sergi Ferré<sup>2</sup>, Arnau Cordomi<sup>3</sup>, Estefania Moreno<sup>1</sup>, Josefa Mallol<sup>1</sup>, Vicent Casadó<sup>1</sup>, Antoni Cortés<sup>1</sup>, Hanne Hoffmann<sup>4</sup>, Jordi Ortiz<sup>4</sup>, Enric I. Canela<sup>1</sup>, Carme Lluís<sup>1</sup>, Leonardo Pardo<sup>3</sup>, Rafael Franco<sup>1,5</sup>, Amina S. Woods<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 251 Bayview Blvd., Baltimore, Maryland, 21224, USA. <sup>3</sup>Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística and <sup>4</sup>Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. <sup>5</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Avda. Pio XII 55, 31008 Pamplona, Spain.

Correspondence should be addressed to Sergi Ferré (sferre@intra.nida.nih.gov)

**G protein-coupled receptor (GPCR) heteromers are macromolecular complexes with unique functional properties different from those of its individual protomers. Little is known about what determines the quaternary structure of GPCR heteromers resulting in their unique functional properties. In the present study, using Resonance Energy Transfer (RET) techniques in experiments with mutated receptors, we provide for the first time clear evidence for a key role of electrostatic interactions in the determination of the quaternary structure of GPCR heteromers between adenosine A<sub>2A</sub>, cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors. In these interactions, arginine-rich epitopes form salt bridges with phosphorylated serine or threonine residues from CK1/2 consensus sites. Each receptor (A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>) was found to include two evolutionary conserved intracellular domains to establish selective electrostatic interactions with intracellular domains of the other two receptors, indicating that these particular electrostatic interactions constitute a general mechanism for receptor heteromerization. The same intracellular domains involved in A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heterodimerization were also involved in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromultimerization and their mutation led to disruption of the quaternary structure and, most importantly, changed the function of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromultimer (change in MAPK signaling), which allowed its identification in rodent brain tissue. These findings allowed us to propose the first molecular model of the quaternary structure of the receptor heteromultimer.**

## INTRODUCTION

Receptor heteromers are the focus of intense research, as through heteromerization receptors become unique functional entities with different properties from those of either receptor when not engaged in heteromerization resulting in new therapeutic targets<sup>1-4</sup>. Their unique properties provide a “biochemical fingerprint” thus allowing their identification in native tissues<sup>1,3</sup>. There is already a long list of discovered heteromers with two different G protein-coupled receptors (GPCRs)<sup>2,4</sup>. Furthermore, we recently obtained evidence for the existence of receptor heteromultimers, i.e. heteromers comprising more than two different receptors and reported on heteromers including the GPCRs adenosine A<sub>2A</sub>, cannabinoid CB<sub>1</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors<sup>5</sup> in transfected cells. Evidence of GPCR homomultimers has also been recently demonstrated in living cells<sup>6,7</sup>. Many important questions regarding receptor heteromers and heteromultimers remain unanswered: What is the arrangement of their GPCR units (quaternary structure)? What are the molecular determinants of their quaternary structure and, last but not least what is their functional significance in native tissues?

Different molecular mechanisms have been inferred to be involved in GPCR homo- and heteromerization. For Family C GPCRs, disulfide bonds between extracellular domains as well as coiled-coil interactions between C-terminal domains seem to be involved in the formation of a functional homomeric or heteromeric receptors<sup>8</sup>. For oligomerization of family A GPCRs, the helical transmembrane (TM) domains seem to be particularly important<sup>7,9-15</sup>. In the present study, by using mutated A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors, we investigated the relevance of electrostatic interactions<sup>16</sup> between intracellular domains in the determination of the quaternary structure of GPCR heteromers between A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors. Our initial goal was to obtain evidence for multiple intracellular interactions in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromultimer. Significantly, the same intracellular domains involved in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromultimerization were also involved in A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> and CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization. A 3D-model of the quaternary structure of the receptor heteromultimer was obtained by using the information from resonance energy transfer between A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the receptor heteromultimer. Furthermore, a biochemical property of the receptor heteromultimer was found to be dependent on its correct quaternary structure, determined by the intracellular electrostatic interactions, which allowed its identification in rodent brain tissue.

## RESULTS

### Quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer

An obvious initial question about receptor heteromers made up of three different receptors is whether each receptor interacts with the other two or not, i.e. if they form a triangular or linear arrangement. As in a prior report<sup>5</sup>, we first demonstrated the ability of A<sub>2A</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors to form heteromers by determining the SRET saturation curve in transfected HEK-293T cells (Fig. 1a). In the same experimental preparation, we found significant BRET<sup>2</sup> and FRET signals between the A<sub>2A</sub>-*Rluc*-D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptor pair and the D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup>-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair, respectively (Fig. 1b). Furthermore, we also detected by BRET<sup>1</sup> assays a positive transfer of energy between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (Fig. 1b). These data and the positive SRET signal (Fig. 1a) in cells co-expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors suggest a

triangular arrangement between the three receptors (Fig. 1c). In fact, taking into account the correlation between FRET efficiency and acceptor/donor distances and that *Rluc*, GFP<sup>2</sup> and YFP are fused to the end of the C-terminus of the receptors, the distance between BRET donors and acceptors can be approximated<sup>17</sup>. Considering the high FRET efficiency between D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (36±3%), the range of the distance between GFP<sup>2</sup> and YFP in the heteromer is estimated to be 5.7-6.1 nm. Thus, a linear arrangement of the three receptors could give a positive SRET signal, but a very much reduced or even non-significant BRET<sup>1</sup> signal between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors, since there is a rapid dissipation of the energy transfer (to the sixth power of the distance). Therefore, assuming that the heterotrimer is the minimal unit, only a triangular arrangement of monomers (Fig. 1c) would make both SRET (Fig. 1a) and BRET<sup>1</sup> (Fig. 1b) possible between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors.

### **Multiple electrostatic interactions in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers**

The amino acid sequence of the human CB<sub>1</sub> receptor contains two highly conserved epitopes with two adjacent Thr and Ser residues (Supplementary Table 1), which have a high probability of CK1/2-dependend phosphorylation (Swiss Prot ‘Net Phos’ Program<sup>18</sup>). They are located in the distal portion of the C-terminus (CT) of the CB<sub>1</sub> receptor (Thr<sub>467</sub> and Ser<sub>468</sub>) and in the middle portion of intracellular loop (IL) 3 (Thr<sub>321</sub> and Ser<sub>322</sub>). The initial working hypothesis was that these CB<sub>1</sub> receptor epitopes, with high probability of phosphorylation, would be relevant to determine the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer, by establishing electrostatic interactions with Arg-rich epitopes located in the A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors.

*The electrostatic interaction between phosphorylated Thr<sub>467</sub>-Ser<sub>468</sub> in the C-terminus of the CB<sub>1</sub> receptor and Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) in the cytoplasm at the end of transmembrane helix 5 of the A<sub>2A</sub> receptor*

We first looked at possible alterations in heteromerization between CB<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> and between CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor in cells co-expressing a mutant CB<sub>1</sub> receptor in which Thr<sub>467</sub>(CT) and Ser<sub>468</sub>(CT) were replaced by Ala (CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup> receptor). In cells co-expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptors there was a reduction of BRET<sup>1</sup> values when compared with those obtained with cells expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP (Fig. 2a). On the other hand, these mutations did not modify the FRET values between D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP, when compared with cells expressing D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP (Supplementary Fig. 1). This mutated CB<sub>1</sub> receptor and all the mutant receptors described below were shown to be well expressed at the membrane level (results not shown). Furthermore, the fact that the mutated CB<sub>1</sub> receptor selectively altered the RET signal when co-expressed with A<sub>2A</sub> but not with the D<sub>2</sub> receptors demonstrates that the results cannot be explained by changes in the membrane expression of the mutant receptor or its putative partner. These results therefore show that Thr<sub>467</sub>(CT) and Ser<sub>468</sub>(CT) of the CB<sub>1</sub> receptor are involved in the molecular interaction with the A<sub>2A</sub> receptor in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromer. The existence of measurable BRET<sup>1</sup> values in cells co-expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptors indicate that the CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup> receptor is still able to interact physically with the A<sub>2A</sub> receptor and that other domains, most likely TM domains (see Introduction) are also involved in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromerization. This CT epitope of the CB<sub>1</sub> receptor was also able to interact

with the A<sub>2A</sub> receptor in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer, as deduced from the low SRET values obtained when CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptor was co-expressed with A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors (Fig. 2b). Furthermore, in cells expressing CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP, A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors, BRET<sup>1</sup> values between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptors and BRET<sup>2</sup> values between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors were significantly reduced while FRET values between D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptors were increased relative to cells expressing non-mutated receptors (Fig. 2c). Since the bioluminescent or fluorescent proteins are fused to the CT of the receptors, these results indicate that expression of CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptors induced a modification of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heteromer, with separation of the CT of CB<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors and A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors and approximation of the CT of CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors.

We then looked for the presence of adjacent Arg residues in intracellular domains of the A<sub>2A</sub> receptor that could potentially interact with the phosphorylated Thr<sub>467</sub>(CT) and Ser<sub>468</sub>(CT) of CB<sub>1</sub> receptor via electrostatic interactions. We found a highly conserved motif, Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) (Supplementary Table 1), located in the cytoplasm at the end of TM5, according to the crystal structure (see Methods). Mass spectrometric analysis demonstrated that a synthetic peptide corresponding to this A<sub>2A</sub> receptor epitope, <sub>198</sub>LRIFLAARR<sub>206</sub>, and a phosphorylated peptide corresponding to the CT of the CB<sub>1</sub> receptor epitope, <sub>462</sub>SVSTDpTpSAE<sub>470</sub>, form stable non-covalent complexes, while the Ala-containing peptides LRIFLAAA and SVSTDAAAE do not (Figs. 2d and 3d). We then investigated whether the A<sub>2A</sub> receptor epitope containing adjacent Arg could be involved in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromerization by using a mutant A<sub>2A</sub> receptor in which Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) were replaced by Ala (A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup> receptor). Cells co-expressing A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors showed lower BRET<sup>1</sup> values than those expressing WT receptors (Fig. 3a). On the other hand, the BRET<sup>1</sup> values between A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-YFP receptors were similar to the values between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-YFP receptors (Supplementary Fig. 1). Hence, the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromer depends on an electrostatic interaction between epitopes located at the CT of the CB<sub>1</sub> receptor and in the cytoplasm at the end of TM5 of the A<sub>2A</sub> receptor. Furthermore, this electrostatic interaction is also involved in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization (Figs. 3b and 3c). In fact, low SRET values were obtained when the A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc* receptor was co-transfected with D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (Fig. 3b). In cells co-expressing A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors, BRET<sup>1</sup> and BRET<sup>2</sup> between the heteromer partners were significantly reduced and FRET values between D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors were increased, compared with cells co-expressing non-mutated receptors (Fig. 3c). Significantly, this outcome is qualitatively the same as the one shown in Fig. 2c with CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP receptor, as it would be expected if both mutants disrupt the same intermolecular interaction.

*The electrostatic interaction between phosphorylated Thr<sub>321</sub>-Ser<sub>322</sub> in intracellular loop 3 of the CB<sub>1</sub> receptor and an Arg-rich epitope in intracellular loop 3 of the D<sub>2</sub> receptor*

Since the Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT)-containing epitope of the CB<sub>1</sub> receptor was found to interact with Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) of the A<sub>2A</sub> receptor, it was expected that Thr<sub>321</sub>(IL3)-Ser<sub>322</sub>(IL3) of the CB<sub>1</sub> receptor could interact with the D<sub>2</sub> receptor. In fact, when co-expressing the mutant CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP and D<sub>2</sub>-*Rluc* receptors, the BRET<sup>1</sup>



energy transfer between *Rluc* and YFP was reduced when compared with BRET<sup>1</sup> values obtained with CB<sub>1</sub>-YFP and D<sub>2</sub>-*Rluc* receptors (Fig. 4a). On the other hand, the BRET<sup>1</sup> values obtained in cells expressing CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP and A<sub>2A</sub>-*Rluc* receptors were similar to those obtained with cells expressing CB<sub>1</sub>-YFP and A<sub>2A</sub>-*Rluc* (Supplementary Fig. 1). These results therefore show that the Thr<sub>321</sub>(IL3)-Ser<sub>322</sub>(IL3) motif of the CB<sub>1</sub> receptor is selectively involved in the intermolecular interactions with the D<sub>2</sub> receptor in the CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. The fact that BRET<sup>1</sup> is still measurable between CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP and D<sub>2</sub>-*Rluc* receptors indicates that, once more, other epitopes are also involved in CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization. Also, the same Thr<sup>321</sup>(IL3)-Ser<sup>322</sup>(IL3) epitope of the CB<sub>1</sub> receptor interacted with the D<sub>2</sub> receptor in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. Compared with non-mutated receptors, co-expression of CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP receptor with A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors showed a reduction in SRET values (Fig. 4b) and FRET values were significantly decreased, BRET<sup>2</sup> values were increased, while BRET<sup>1</sup> values were not modified (Fig. 4c). This suggests that replacement of Thr<sub>321</sub>(IL3) and Ser<sub>322</sub>(IL3) by Ala in CB<sub>1</sub> receptor induces a modification of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer with separation of the CT of the CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors and an approximation of the CT of the D<sub>2</sub> and A<sub>2A</sub> receptors. Thus, CB<sub>1</sub> receptor uses two different CK1/2-dependent phosphorylatable epitopes, located in their CT (Thr<sub>467</sub>-Ser<sub>468</sub>) and IL3 (Thr<sub>321</sub>-Ser<sub>322</sub>) domains, to establish simultaneous electrostatic interactions with the A<sub>2A</sub> epitope located at the end of TM5 and D<sub>2</sub> receptors, respectively, in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer.

Next step was finding out which intracellular epitope of the D<sub>2</sub> receptor is involved in CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization. D<sub>2</sub> receptor contains two highly conserved Arg-rich epitopes (Supplementary Table 1), <sub>215</sub>(5.64)VLRRRKRVN<sub>224</sub>, located at the end of TM5 in the cytoplasm (according to the homology modeling using the β<sub>2</sub> adrenergic receptor as a template; see Methods), and (<sub>266</sub>NR<sub>RR</sub>VEAARR<sub>275</sub>), in the middle of IL3. Since the VLRRRKRVN epitope is most probably involved in A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization<sup>19,20</sup>, we explored the possibility that IL3 of the D<sub>2</sub> receptor could interact with IL3 of the CB<sub>1</sub> receptor (phosphorylated Thr<sub>321</sub>-Ser<sub>322</sub>). The D<sub>2</sub> short isoform (D<sub>2S</sub>), an alternative splicing that lacks 29 amino acid residues of IL3<sup>21</sup>, including <sub>266</sub>NR<sub>RR</sub>VEAARR<sub>275</sub>, was used. SRET values were clearly reduced when D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> receptor was co-expressed with A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (Fig. 5b). Significantly, the D<sub>2S</sub> receptor led to the same qualitative modifications of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer as those induced by CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP receptor (Fig 5c). Thus, in cells expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc*, CB<sub>1</sub>-YFP and D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors, FRET values between D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors were significantly decreased, while BRET<sup>2</sup> values between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors were increased, and BRET<sup>1</sup> values between A<sub>2A</sub>-*Rluc* and CB<sub>1</sub>-YFP receptors were not modified, when compared with cells co-expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (Fig. 5c). These results indicate that in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer, CB<sub>1</sub> receptors interact with the Arg-rich domain located in IL3 of the D<sub>2</sub> receptor.

Notably, expression of D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> or D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors with either A<sub>2A</sub>-*Rluc* or CB<sub>1</sub>-YFP receptors gives similar BRET<sup>2</sup> (Fig. 5a) or FRET (Supplementary Fig. 1) values, respectively. This indicates that in the absence of the <sub>266</sub>NR<sub>RR</sub>VEAARR<sub>275</sub> epitope in D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup>, the CB<sub>1</sub> receptor can potentially interact with the other Arg-rich domain, <sub>215</sub>(5.64)VLRRRKRVN<sub>224</sub>, present in both isoforms of the D<sub>2</sub> receptor. As

expected, mass spectrometric analysis demonstrated that a synthetic peptide of the epitope located in IL3 of the CB<sub>1</sub> receptor (<sub>321</sub>pTpSEDGKVQVT<sub>330</sub>), but not its equivalent Ala-containing peptide (AAEDGKVQVT), formed stable non-covalent complexes with the two Arg-rich epitopes of the D<sub>2</sub> receptor [<sub>215</sub>(5.64)VLRRRRKRNVN<sub>224</sub> and <sub>266</sub>NRRRVEAARR<sub>275</sub>] (Figs. 4d and 6d).

*The electrostatic interaction between phosphorylated Ser<sub>374</sub> in the C-terminus of the A<sub>2A</sub> receptor and an Arg-rich domain in the cytoplasm at the end of transmembrane helix 5 of the D<sub>2</sub> receptor*

The <sub>215</sub>(5.64)VLRRRRKRNVN<sub>224</sub> epitope of the D<sub>2</sub> receptor was shown to be involved in A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization by interacting with the CT domain of the A<sub>2A</sub> receptor<sup>19,20</sup>. We found a dramatic reduction of BRET<sup>1</sup> values in cells co-expressing a mutant A<sub>2A</sub>-Rluc receptor, in which Ser<sub>374</sub>(CT) was replaced by Ala (A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-Rluc receptor), and D<sub>2</sub>-YFP receptor (Fig. 6a). On the other hand, co-expression of A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-Rluc and CB<sub>1</sub>-YFP receptors gave similar BRET<sup>1</sup> values than WT receptors (Supplementary Fig. 1). These results confirm that Ser<sub>374</sub>(CT) of the A<sub>2A</sub> receptor is involved in the molecular interaction with the D<sub>2</sub> receptor. Not surprisingly, Ser<sub>374</sub>(CT) of the A<sub>2A</sub> receptor was also found to be involved in providing the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. Low SRET values were obtained when A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-Rluc was co-expressed with D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (Fig. 6b), compared with cells co-expressing the non-mutated receptors. From the analysis of BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET occurring between partners in cells expressing A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-Rluc, CB<sub>1</sub>-YFP and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors, it was observed that BRET<sup>2</sup> values were significantly reduced, while FRET and BRET<sup>1</sup> values were not significantly modified (Fig. 6c). These results indicate that the CT-mutated A<sub>2A</sub> receptor induces a modification of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer, with separation of the CT of the A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors. Therefore, the A<sub>2A</sub> receptor uses an adjacent-Arg motif [Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67)] and a CK1/2-dependent phosphorylatable epitope located in CT (Ser<sub>374</sub>) to establish selective electrostatic interactions with the CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors respectively. Hence, mass spectrometric analysis of a mixture of peptides corresponding to TM5 of the D<sub>2</sub> [<sub>215</sub>(5.64)VLRRRRKRNVN<sub>224</sub>] and the CT epitopes of the A<sub>2A</sub> receptor (<sub>370</sub>SAQEpSQGNT<sub>378</sub>) and the mutant A<sub>2A</sub> receptor (<sub>370</sub>SAQEAQGNT<sub>378</sub>), demonstrated non-covalent complexes between the D<sub>2</sub> and the A<sub>2A</sub> receptor epitopes, but not in the case of the mutant A<sub>2A</sub> receptor (Fig. 6d).

### **Computational model of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer**

Biochemical and biophysical studies have suggested that oligomerization of class A GPCRs primarily involves TMs 1, 4, or/and 5<sup>7,9-15</sup>. Thus, the structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer was modeled using the following dimeric interfaces: TM1-TM1, TM4-TM4<sup>invago</sup>, TM4-TM4<sup>ago</sup>, and TM5-TM5 (see Methods). TM4-TM4<sup>invago</sup> and TM4-TM4<sup>ago</sup> stand for the proposed rearrangement of the oligomerization interface that has been observed for the dopamine D<sub>2</sub> receptor upon inverse agonist and agonist binding, respectively<sup>12</sup>

### *Modeling the CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer*

Initially, in order to discern which of these TM interfaces most favorably permits the proposed electrostatic interaction between phosphorylated Thr<sub>321</sub>(IL3)-Ser<sub>322</sub>(IL3) of CB<sub>1</sub> and <sup>266</sup>NRRRVEAARR<sub>275</sub>(IL3) of D<sub>2</sub> in the CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer all possible dimeric interfaces were constructed (Supplementary Fig. 2). It is important to acknowledge the difficulty of modeling IL3 of either CB<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors unambiguously (see Methods), thus, the exact location of these epitopes in IL3 cannot be determined. Nevertheless, it seems clear to us that the TM1-TM1, TM4-TM4<sup>invago</sup> and TM4-TM4<sup>ago</sup> interfaces position IL3 of CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in opposite sides of the TM bundles (Supplementary Figures 2a-2c), which makes the proposed electrostatic interaction difficult. In contrast, the TM5-TM5 interface positions IL3 of the CB<sub>1</sub> receptor contiguous to IL3 of the D<sub>2</sub> receptor (Supplementary Figure 2d), facilitating their electrostatic interaction. It, thus, seems reasonable to propose that the Arg-rich epitope of the D<sub>2</sub> receptor located in the cytoplasm at the end of TM5 is involved in CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization.

### *Modeling the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromer*

The A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> receptor heteromer was also modeled through the entire set of TM interfaces (Supplementary Fig. 3) to reproduce the electrostatic interaction between phosphorylated Thr<sub>467</sub>-Ser<sub>468</sub> in CT of the CB<sub>1</sub> receptor and Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) in the cytoplasm at the end of TM5 of the A<sub>2A</sub> receptor. CT of the CB<sub>1</sub> receptor is made of 59 amino acids (Ser<sub>414</sub>-Leu<sub>472</sub>), in addition to the conserved Hx8 that runs parallel to the membrane (Ser<sub>401</sub>-Pro<sub>413</sub>). It is, thus, difficult to determine with precision the position of Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT). However, although GPCRs CT vary greatly in length and sequence, we have assumed that CB<sub>1</sub>'s CT unfolds towards TM6 as found in the crystal structure of squid rhodopsin<sup>22</sup>. Taking these facts into account, TM4-TM4<sup>invago</sup>, TM4-TM4<sup>ago</sup>, and TM5-TM5 interfaces between CB<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> receptors would allow the electrostatic interaction between Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT) and Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) in the A<sub>2A</sub> receptor. (Supplementary Fig. 3b-3d), while the TM1-TM1 interface would not (Supplementary Fig. 3a).

### *Modeling the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer*

The quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heteromer was finally obtained by combining the CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> (TM5-TM5 interface) and CB<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> (TM4-TM4<sup>invago</sup>) models described above (Fig. 7a). This combination of TM-TM interactions was selected among the others because it best reproduces the distance between GFP and YFP in the proposed A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer within the 5.7-6.1 nm range experimentally determined from FRET efficiencies (see above). Fig. 7b shows a molecular model of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heteromer, in which GFP was fused to Cys<sub>443</sub>(CT) of the D<sub>2</sub> receptor at the end of the conserved Hx8; YFP was fused to Leu<sub>472</sub>(CT) of the CB<sub>1</sub> receptor, only four amino acids apart from the phosphorylated Ser<sub>468</sub>(CT); and Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT) of the CB<sub>1</sub> receptor could interact with Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) of the A<sub>2A</sub> receptor. In addition, this computational model of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer positioned the CT of the A<sub>2A</sub> receptor toward the D<sub>2</sub> receptor epitope located in the cytoplasm at the end of TM5, so that phosphorylated Ser<sub>374</sub>(CT) can interact with the (5.64) <sup>215</sup>VLRRRRKRVN<sub>224</sub> epitope (Figs. 7a and 7c).

As it was shown above, expression of the CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP or A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-*Rluc* mutant receptors leads to a separation of the CT of CB<sub>1</sub> from A<sub>2A</sub> and the CT of A<sub>2A</sub> from D<sub>2</sub>, respectively. This clearly suggests that phosphorylated Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT) in CB<sub>1</sub> or Ser<sub>374</sub>(CT) in A<sub>2A</sub> serve to maintain the large and flexible CT of the receptors in the proper conformation by interacting with the Arg-rich epitope of the corresponding promoter. It, thus, seems reasonable to suggest that the absence of Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT) in CB<sub>1</sub> or Ser<sub>374</sub>(CT) in A<sub>2A</sub> modifies the CT of the mutant receptors, whereas the packing of the TMs in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heteromer remains similar.

### **Structure-function relationship in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer**

We explored the possibility that changes in the quaternary structure of A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer after disruption of the electrostatic interactions could correlate with changes in the receptor heteromer function. We first looked for differences in signaling (activation of the MAPK pathway) in cells co-expressing A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors in the absence and presence of CB<sub>1</sub> receptors (Fig. 8). In cells co-expressing A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors, co-activation of both receptors with their respective selective agonists CGS 21680 (200 nM) and quinpirole (1 μM) produced a similar degree of ERK1/2 phosphorylation than activation of either A<sub>2A</sub> or D<sub>2</sub> receptors. As shown in Fig. 8a, the additional co-expression of CB<sub>1</sub> receptor produced a qualitatively different pattern with a significantly higher effect of co-activation of A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors compared with cells expressing only A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors. We then demonstrated that this pattern of MAPK activation is a biochemical characteristic of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer, since it depends on the integrity of its quaternary structure. In fact, we found that it particularly depends on the integrity of the intracellular electrostatic interactions that the CB<sub>1</sub> receptor forms with the D<sub>2</sub> receptor in A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. Thus, in cells expressing CB<sub>1</sub><sup>A321-A321</sup> or D<sub>2S</sub> receptors (which lose the ability to establish electrostatic interactions with the D<sub>2</sub> or the CB<sub>1</sub> receptors, respectively, in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer), the pattern of MAPK activation was significantly altered and qualitatively similar to that observed in cells only co-expressing A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors (Fig 8b).

The pattern of MAPK activation could then be used as a biochemical fingerprint of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer to detect its presence in the brain<sup>3</sup>. In fact, comparing the pattern of ERK1/2 phosphorylation upon activation of A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors in striatal slices from wild-type mice and CB<sub>1</sub> receptor knockout mice, we found the same qualitative differences than those observed in co-transfected cells with and without CB<sub>1</sub> receptors (compare Figs. 8a and 8c). Thus, in striatal slices from CB<sub>1</sub> receptor knockout mice there was a significantly lower ERK1/2 phosphorylation upon co-activation of A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors compared with that obtained from striatal slices from wild-type animals. A bifactorial ANOVA demonstrated a significant genotype effect ( $p < 0.05$ ) and significant treatment/genotype interaction ( $p < 0.05$ ) and post-hoc Bonferroni tests only showed a significant difference between both groups when the striatal slices were co-treated with CGS 21680 (1 μM) and quinpirole (1 μM) (Fig. 8c).

### **DISCUSSION**

The present study shows, for the first time, that GPCR heteromers display emerging properties which depend on their folding into a certain quaternary structure, determined not only by interactions between TM domains, but also involving interactions between

hydrophilic intracellular domains. Significantly, we have found that each receptor, A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>, contains two key intracellular domains to interact in a selective manner with intracellular domains of the other two receptors by means of electrostatic interactions in the formation of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>, CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> and A<sub>1</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers. Thus, D<sub>2</sub> receptor contains two Arg-rich epitopes, <sup>215</sup>VLRRRKRNVN<sub>224</sub> and <sup>266</sup>NRRRVEAARR<sub>275</sub> that interact with potential CK1/2-dependent phosphorylatable Ser/Thr residues in CT (Ser<sub>374</sub>) of the A<sub>2A</sub> receptor and in IL3 (Thr<sub>321</sub>-Ser<sub>322</sub>) of the CB<sub>1</sub> receptor, respectively; CB<sub>1</sub> receptor contains adjacent phosphorylatable Ser and Thr residues in IL3 (Thr<sub>321</sub> and Ser<sub>322</sub>) and CT (Thr<sub>467</sub> and Ser<sub>468</sub>) that interact with Arg residues in IL3 (<sup>266</sup>NRRRVEAARR<sub>275</sub>) of the D<sub>2</sub> receptor and (Arg<sub>205</sub>-Arg<sub>206</sub>) of the A<sub>2A</sub> receptor, respectively; and A<sub>2A</sub> receptor contains Arg residues at the end of TM5 in the cytoplasm at (Arg<sub>205</sub>-Arg<sub>206</sub>) and a phosphorylatable Ser residue in CT (Ser<sub>374</sub>) which interact with phosphorylatable Ser/Thr residues in the CB<sub>1</sub> receptor's CT (Thr<sub>467</sub> and Ser<sub>468</sub>) and an Arg-rich epitope of the D<sub>2</sub> receptor located in the cytoplasm at the end of TM5 (<sup>215</sup>VLRRRKRNVN<sub>224</sub>), respectively. The fact that each of these three receptors forms electrostatic interactions involving evolutionary conserved adjacent Arg residues and CK1/2-dependent phosphorylatable Ser and Thr residues with the other two receptors suggests that these particular electrostatic interactions constitute a general mechanism for receptor heteromerization. In studies using synthetic peptides it has been shown that these electrostatic interactions are particularly stable. Thus, the Arg-Phosphate interaction is so stable that when using collision-induced dissociation, the non-covalent interactions between the Arg guanidinium groups and the phosphate group remain intact even though the covalent bond between the serine and phosphate brakes<sup>16,23-25</sup>.

Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (RET) techniques with mutant receptors we propose for the first time the quaternary structure for three interacting GPCRs. Characterization of protomer organization within the A<sub>1</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer requires, in addition to our findings, integration of information from a variety of different approaches. Most compelling are studies that apply disulphide cross-linking to map TM interfaces between protomers<sup>10,,12,13</sup>. Modeling of the CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> receptor heterodimers was performed through the entire set of proposed TM interfaces (i.e. TM1, TM4, or TM5). Our results are compatible with models proposed for other Family A GPCRs, where oligomerization involves primarily TM4 and TM5 interfaces (Fig. 7). Thus, our study supports a triangular rather than a linear arrangement of receptors in the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> heteromer. This arrangement allows the possibility of simultaneous homodimerization of each receptor unit using the TM1 interface, which is a well-established phenomenon in the GPCR's field. Thus, this study opens up a new conceptual challenge in the field of receptor heteromerization, which is the idea that GPCRs can form not only heteromultimers of three different receptor units, but also higher-order heteromultimers, or "receptor nets".

The interactions of the intracellular domains of the CB<sub>1</sub> receptor with A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors were found to be fundamental for the correct formation of the quaternary structure needed for the function of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers. Thus, mutant receptors lacking the interacting amino acids significantly disrupted RET and a specific qualitative pattern of ERK1/2 phosphorylation induced by co-activation of A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptors. The fact that such a disruption of the quaternary structure of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>

receptor heteromer (as demonstrated by SRET experiments) was associated with a significant qualitative change in signaling indicates that electrostatic interactions between intracellular domains are also key determinants for the specific biochemical properties of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. These biochemical characteristics and the specific qualitative pattern of MAPK activation could be used as a biochemical fingerprint of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer presence in the brain. CB<sub>1</sub> receptor KO mice experiments provided strong support for the existence of A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer in the striatum. It has been hypothesized that A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers are mostly located in one subtype of striatal neuron, the GABAergic enkephalinergic neuron, where the three receptors are highly co-expressed and exert a significant control of basal ganglia function<sup>26</sup>. Most probably, the results obtained with MAPK signaling are just a minor but the first described example of many of the potential properties of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromers.

## METHODS

**Cell Culture.** HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco Paisley, Scotland, UK) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 5% (v/v) heat inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). CHO cell lines were maintained in  $\alpha$ -MEM medium without nucleosides, containing 10% fetal calf serum, 50  $\mu$ g/mL penicillin, 50  $\mu$ g/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (300  $\mu$ g/mL). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and were passaged when they were 80-90% confluent, twice a week.

**Mutant receptors.** The Ser<sub>374</sub> in the C-terminal domain of the human A<sub>2A</sub> receptor was mutated to Ala to obtain the A<sub>2A</sub><sup>A374</sup> receptor. The sequence <sub>199</sub>RIFLAARRQ<sub>207</sub> in the cytoplasm at the end of TM5 of human A<sub>2A</sub> receptor was mutated to <sub>199</sub>RIFLAAAAQ<sub>207</sub> to obtain the A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup> receptor. The sequence <sub>462</sub>SVSTDTSAE<sub>470</sub> in the C-terminal domain of human CB<sub>1</sub> receptor was mutated to <sub>462</sub>SVSTDAAAE<sub>470</sub> to obtain the CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup> receptor. The sequence <sub>321</sub>TSEDGKVQVT<sub>330</sub> in the third intracellular loop of human CB<sub>1</sub> receptor was mutated to <sub>321</sub>AAEDGKVQVT<sub>330</sub> to obtain CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup> receptor. Mutations were performed by site-directed mutagenesis (Cellogenetics, Ijamsville, MD, USA).

**Fusion Proteins and Expression Vectors.** The human cDNAs of the A<sub>2A</sub>, CB<sub>1</sub> and the mutant versions of these receptors or the human D<sub>2</sub>, D<sub>2s</sub> and D<sub>4.4</sub> receptors, cloned in *pcDNA3.1* were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring unique EcoRI and BamHI sites to clone A<sub>2A</sub>, A<sub>2A</sub><sup>A374</sup> and A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup> receptors in the *Rluc* corresponding vector, EcoRI and KpnI to clone D<sub>2</sub> and D<sub>2s</sub> receptors in the GFP<sup>2</sup> corresponding vector and BamHI and EcoRI to clone CB<sub>1</sub>, CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup> and CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup> in the EYFP corresponding vector and XhoI and BamHI sites to clone D<sub>4.4</sub> receptor in the *Rluc* corresponding vector. The amplified fragments were subcloned to be in-frame into restriction sites of the multiple cloning sites of *pcDNA3.1-Rluc*, *pGFP<sup>2</sup>-N3(h)*, *pEYFP-N1* (Clontech, Heidelberg, Germany) to give the plasmids corresponding to A<sub>2A</sub>-*Rluc*, A<sub>2A</sub><sup>A374</sup>-*Rluc*, A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc*, D<sub>4</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup>, D<sub>2s</sub>-GFP<sup>2</sup>, CB<sub>1</sub>-YFP, CB<sub>1</sub><sup>A467-A468</sup>-YFP and CB<sub>1</sub><sup>A321-A322</sup>-YFP receptor fusion proteins. The cDNA of the

5HT<sub>2B</sub>-YFP fusion protein was kindly provided by Dr. Irma Nardi (University of Pisa, Italy). Under in these conditions, the fusion proteins are expressed at the membrane level, are not strongly over-expressed and are quantitatively expressed in similar amounts<sup>5</sup>.

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

**BRET Experiments.** HEK-293T cells expressing the corresponding donor (receptor-*Rluc*) and increasing amounts of the corresponding acceptor (receptor-GFP<sup>2</sup> for BRET<sup>2</sup> or receptor-YFP for BRET<sup>1</sup>), as indicated in figure legends, were used. With aliquots of transfected cells (20 µg of protein), three different determinations were performed in parallel: i) To quantify fluorescence proteins expression, cells were distributed in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and fluorescence was read in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using an excitation filter at 410 nm for receptor-GFP<sup>2</sup> reading (BRET<sup>2</sup>) or 485 nm for receptor-YFP reading (BRET<sup>1</sup>) and emission was detected using filters at 510 nm (for GFP<sup>2</sup>) or 530 nm (for YFP). Receptor-fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing receptor-*Rluc* alone. ii) For BRET<sup>2</sup> and BRET<sup>1</sup> measurements, the equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96 well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and 5 µM DeepBlueC (BRET<sup>2</sup>) or coelenterazine H (BRET<sup>1</sup>) (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. For BRET<sup>2</sup> experiments, readings were collected immediately (approximately 30 s) after addition of DeepBlueC using a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, DLReady, Germany) that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 410 nm and the long-wavelength filter at 510 nm. In BRET<sup>1</sup> after 1 minute of adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. iii) To quantify receptor-*Rluc* expression luminescence readings were performed after 10 minutes of adding 5 µM coelenterazine H. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the *Rluc* construct expressed alone in the same experiment.

**FRET Experiments.** HEK-293T cells expressing the corresponding donor (receptor-GFP<sup>2</sup>) and increasing amounts of the corresponding acceptor (receptor-YFP), as indicated in figure legends, were used. Using aliquots of transfected cells (20 µg of protein), two different determinations were performed in parallel: i) To quantify YFP fluorescence, due to receptor-YFP expression, the same procedure as described for BRET experiments was used. ii) For FRET measurements, the equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed into 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and read in a Fluostar Optima Fluorimeter equipped with a high-energy xenon flash lamp, using an excitation filter at 410 nm and an emission filters at 510nm (Ch<sub>x</sub>) and 530 nm (Ch<sub>y</sub>). Gain settings were identical for all experiments to keep the relative contribution of the fluorophores to the detection channels constant for spectral un-mixing. The contribution of GFP<sup>2</sup> and YFP proteins alone, to the two detection channels (spectral signature, Zimmermann *et al.*, 2002) was measured in experiments with cells expressing only one of these proteins and normalized to the sum of the signal obtained in the two detection channels. The spectral signatures of the different receptors fused to either GFP<sup>2</sup> or YFP did not vary significantly from the determined spectral signatures of the fluorescent proteins alone. In i) and ii) linear un-mixing was done taking into account the spectral signature as described by Zimmermann *et al.*<sup>17</sup> to separate the two emission spectra. For quantitation of the fluorescence emitted by each of two individual fluorophores (FluoA corresponding to the donor and FluoB corresponding to the acceptor) in FRET experiments, the following general formula was applied:

$$\text{FluoA} = S / (1 + 1/R) \quad \text{FluoB} = S / (1 + R)$$

Being:

$$S = Ch_x + Ch_y \quad R = (B_y Q - B_x) / (A_x - A_y Q) \quad Q = Ch_x / Ch_y$$

where  $Ch_x$  and  $Ch_y$  represent the signals in detection channels  $x$  and  $y$ , and  $A_x$ ,  $B_x$  and  $A_y$ ,  $B_y$  represent the normalized contributions of FluoA or FluoB to channels  $x$  and  $y$ , as they are known from the spectral signatures of the fluorescent proteins.

**Sequential Resonance Energy Transfer (SRET) Experiments.** The recently introduced sequential BRET-FRET (SRET) technique<sup>5</sup> not only allows the demonstration of heteromerization of three proteins, but can also provide information about the quaternary structure of the heterotrimeric complex. By transfecting three receptors separately fused to *Rluc*, GFP<sup>2</sup> and YFP, the detection of the SRET<sup>2</sup> signal demonstrates the physical interactions between the three receptors. In SRET<sup>2</sup> the oxidation of the *Rluc* substrate DeepBlueC triggers GFP<sup>2</sup> excitation (BRET<sup>2</sup>), which triggers a subsequent excitation of YFP (FRET) (see Fig. 1). Emission of YFP after addition of DeepBlueC is only possible if the three fusion proteins are in close proximity (<10 nm), allowing bioluminescent and fluorescent sequential resonance energy transfer (SRET) to occur. For SRET experiments, HEK-293T cells were transiently co-transfected with the indicated amounts of plasmid cDNAs corresponding to receptor-*Rluc*, receptor-GFP<sup>2</sup> and receptor-YFP (see figure legends). Using aliquots of transfected cells (20 µg of protein), different determinations were performed in parallel: i) Quantification of protein-YFP expression was performed as indicated in FRET experiments. The sample fluorescence is the fluorescence calculated as described minus the fluorescence of cells expressing only protein-*Rluc* and protein-GFP<sup>2</sup>. ii) Quantification of protein-*Rluc* expression by determination of the luminescence due to protein-*Rluc*. Cells were distributed in 96-well



microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and luminescence was determined 10 minutes after addition of 5  $\mu\text{M}$  coelenterazine H in a Mithras LB 940 multimode reader. iii) SRET measurements. Cells were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and 5  $\mu\text{M}$  DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. The SRET<sup>2</sup> signal was collected using a Mithras LB 940 reader with detection filters for short-wavelength (410 nm) and long-wavelength (530 nm). By analogy with BRET, net SRET<sup>2</sup> is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for cells expressing protein-Rluc and protein-GFP<sup>2</sup>. Linear un-mixing was done for SRET<sup>2</sup> quantification, taking into account the spectral signature to separate the two fluorescence emission spectra<sup>17</sup>; iv) Using aliquots of cells transfected for SRET experiments, BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET measurements were performed as indicated above

### **ERK phosphorylation assays**

Wild-type littermates and CB<sub>1</sub> receptor knock out CD1 albino Swiss male mice, 8 weeks old, weighing 25 g of weight were used. The generation of mice lacking CB<sub>1</sub> receptor has been described elsewhere<sup>27,28</sup>. Mice were housed five per cage in a temperature (21  $\pm$  1°C) and humidity-controlled (55  $\pm$  10%) room with a 12:12 hours light/dark cycle (light between 08:00 and 20:00 hours) with food and water *ad libitum*. Animal procedures were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Local Ethical Committee (IMAS-IMIM/UPF). Mice were decapitated with a guillotine and the brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:95%/5%) Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose and 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4). The brains were sliced at 4°C in a brain matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA.) into 0.5 mm coronal slices. Slices were kept at 4°C in Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer during the dissection of the striatum. Each slice was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer. The temperature was raised to 23°C and after 30 min, the media was replaced by 2 ml Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer (23°C). The slices were incubated under constant oxygenation (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:95%/5%) at 30°C for 4-5 h in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA). The media was replaced by 200  $\mu\text{l}$  of fresh Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer and after 30 min 1  $\mu\text{M}$  of the A<sub>2A</sub> receptor agonist CGS-21680, 1  $\mu\text{M}$  of the D<sub>2</sub> receptor agonist quinpirole or both prepared in Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer were added. After 10 min the incubation solution was discarded and slices were frozen on dry ice and stored at -80°C. When ERK phosphorylation assays were performed in cell cultures, CHO cells (48 h after transfection) were cultured in serum-free medium for 16 h before the addition of any agent. Cells were resuspended in HBSS buffer and were treated for 5 min with CGS2168 (200 nM), quinpirole (1  $\mu\text{M}$ ) or a mixture of both ligands and rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline. Both, cells and slices were lysed by the addition of 500  $\mu\text{L}$  of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20  $\mu\text{M}$  phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO<sub>4</sub> and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C and the protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standard. To determine the level of ERK1/2

phosphorylation, equivalent amounts of protein (10  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on a denaturing 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes. The membranes were then probed with a mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (Sigma, 1:2500). In order to rule out that the differences observed were due to the application of unequal amounts of lysates, PVDF blots were stripped and probed with a rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both, phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 (Sigma, 1:40000). Bands were visualized by the addition of anti-mouse HRP conjugated (Dako, Glostrup, Denmark) or anti-rabbit HRP conjugated (Sigma) secondary antibodies, respectively, and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Bands densities were quantified with a LAS-3000 (Fujifilm) and the level of phosphorylated ERK1/2 isoforms was normalized for differences in loading using the total ERK protein band intensities. Quantitative analysis of detected bands was performed by Image Gauge V4.0 software. Bifactorial ANOVA and post-hoc Bonferroni tests were used for statistical comparisons

**Mass Spectrometric Analysis.** 0.3  $\mu$ l of equimolar solutions of the various peptides were deposited on the sample plate followed by 0.3  $\mu$ l matrix, a saturated solution of 2,4,6-trihydroxyacetophenone in 50% ethanol and left to dry at room temperature. Spectra of each sample spot were acquired using a MALDI TOF-TOF instrument (Applied Biosystem 4700 proteomics analyzer, Framingham Massachusetts, USA) in positive ion mode. Each spectrum is the average of 1000 shots. All peptides were synthesized at the Johns Hopkins School of Medicine "Synthesis & Sequencing Facility".

**Computational models of dopamine D<sub>2</sub>, cannabinoid CB<sub>1</sub>, and adenosine A<sub>2A</sub> receptors.** The amino acid sequences of the human D<sub>2</sub> receptor (accession number P14416), CB<sub>1</sub> receptor (P21554), and A<sub>2A</sub> receptor (P29274) receptors were extracted from UniProt (<http://www.uniprot.org>). Structural simulations of the A<sub>2A</sub> receptor are based on its crystal structure (PDB id 3EML)<sup>29</sup>. Simulations of the D<sub>2</sub> and CB<sub>1</sub> receptors are based on computational models constructed by homology modeling techniques using the crystal structure of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor (PDB id 2RH1)<sup>30,31</sup> as template. Because of the absence of P5.50 Ballesteros-Weinstein numbering<sup>32</sup> in the CB<sub>1</sub> receptor, we superimposed Tyr<sub>292</sub>(5.58) and Lys<sub>300</sub>(5.66) to Tyr<sub>119</sub>(5.58) and Lys<sub>227</sub>(5.66) of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Tyr5.58 and Lys5.66 are structural and functional amino acids involved in the stabilization of the active state by interacting with Arg3.50 and Asp/Glu6.30, respectively, as revealed by the recent crystal structure of the ligand-free opsin, which contains several distinctive features of the active state<sup>33</sup>. The highly conserved NPxxYx<sub>n=5,6</sub>F(K/R) motif at the junction between TM7 and Hx8 is one residue shorter in the  $\beta_2$ -adrenergic receptor (n=5) than in rhodopsin and D<sub>2</sub> or CB<sub>1</sub> receptors (n=6). Thus, this junction in D<sub>2</sub> or CB<sub>1</sub> receptors was modeled as in rhodopsin (PDB ids 1GZM and 2Z73)<sup>22,34</sup>. The unambiguous assignment of the TMs boundaries to a particular position is not possible. However, we have assumed that TM5 of A<sub>2A</sub> extends to position Arg<sub>206</sub>(5.67) as shown in the crystal structure<sup>29</sup>, and TM5 of D<sub>2</sub> extends to position Arg<sub>220</sub>(5.69) according to the  $\beta_2$ -based homology model<sup>30,31</sup>. These definitions of TM5 cause Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) of the A<sub>2A</sub> receptor and <sub>215</sub>(5.64)VLR<sub>RRRR</sub>KRVN<sub>224</sub> of the D<sub>2</sub> receptor to be located at the end of TM5 in the cytoplasm. In contrast, the Swiss-Prot database assigns these epitopes of A<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> in

IL3. The crystal structure of squid rhodopsin (PDB id 2Z73) has shown that in addition to the conserved amphipathic Hx8 that runs parallel to the membrane, the CT expands toward TM6<sup>22</sup>. However, the structural homology, among GPCRs, does probably not extend to this C-tail domain because of its high variability in length and amino acid composition among the members of the family. This C-tail is formed by 59 amino acids in the CB<sub>1</sub> receptor (Ser<sub>414</sub>-Leu<sub>472</sub>), only 1 amino acid in the D<sub>2</sub> receptor (Cys<sub>443</sub>) and 104 amino acids in the A<sub>2A</sub> receptor (Arg<sub>309</sub>-Ser<sub>412</sub>). Nevertheless, Ser<sub>414</sub>-Asn<sub>437</sub> of the CB<sub>1</sub> receptor and Arg<sub>309</sub>-Gly<sub>330</sub> of the A<sub>2A</sub> receptor, forming part of this C-tail sequence, were modeled, in an arbitrary manner, based on the structure of squid rhodopsin.

**Computational models of receptor heteromers.** Cysteine cross-linking experiments have suggested that receptor oligomerization involves the surfaces of TMs 1, 4, or/and 5<sup>10,12,13</sup>. Thus, the structures of receptor heteromers were modeled in such a manner that substituted cysteines at position 1.35 could be cross-linked (TM1-TM1)<sup>13</sup>; or positions 4.41, 4.44, 4.48, 4.51, and 4.59 (TM4-TM4<sup>invago</sup>)<sup>12</sup>; or positions 4.50, 4.54, and 4.58 (TM4-TM4<sup>ago</sup>)<sup>12</sup>; or position 5.41 (TM5-TM5)<sup>12</sup>.

### Acknowledgements

We thank Professor Olga Valverde and Catherine Ledent (Department of Experimental and Health Sciences. Biomedical Research Park of Barcelona. University Pompeu Fabra. Barcelona) for generously supply wild-type and CB<sub>1</sub> receptor KO mice. We thank the Office of National Drug Control Policy (ONDCP) and Jodie Franklin (Johns Hopkins Synthesis & Sequencing Facility) for the peptide synthesis. We acknowledge the technical help obtained from Jasmina Jiménez (Molecular Neurobiology laboratory, Barcelona University). This study was supported by Grants from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2008-00146 and SAF2006-05481 and SAF2008-03229-E/ for ERA-NET Coordination of Research Activities) and from Instituto de Salud Carlos III (RD07/0067/0008), grant 060110 from Fundació La Marató de TV3 and from Intramural Funds of the National Institute on Drug Abuse.

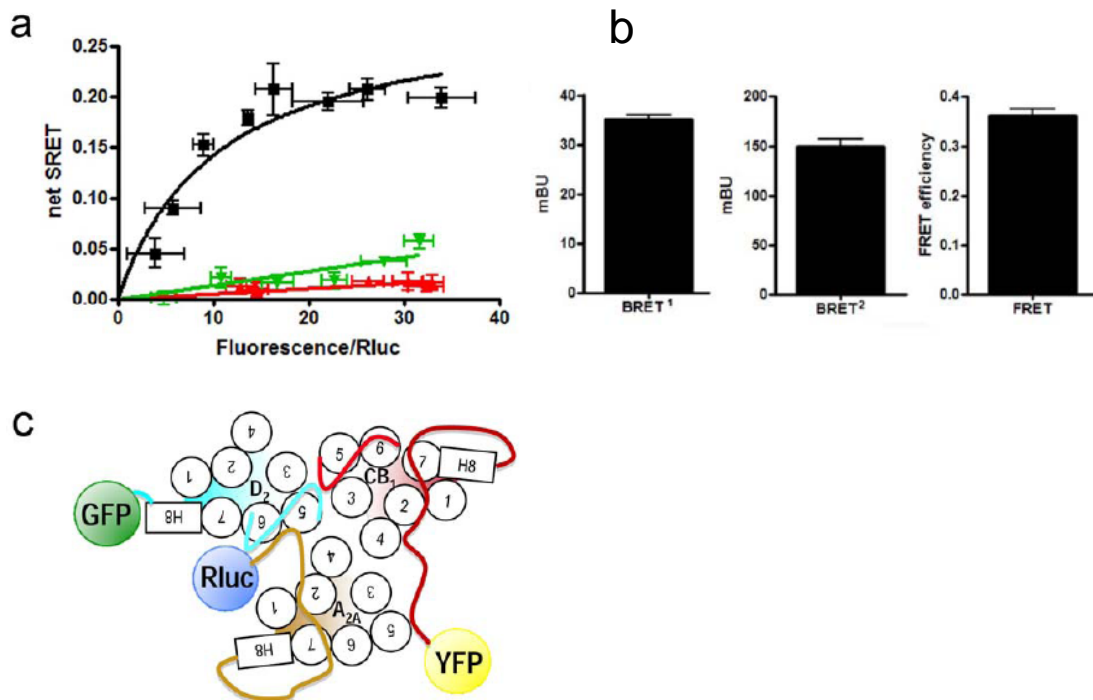
### References

1. Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C. & Franco, R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* **30**, 440-446 (2007).
2. Pin, J.P. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* **59**, 5-13 (2007).
3. Ferré, S. *et al.* Building a new conceptual framework for receptor heteromers." *Nat. Chem. Biol.* **5**, 131-134 (2009).
4. Dalrymple, M.B., Pflieger, K.D. & Eidne, K.A. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol. Ther.* **118**, 359-371 (2008).
5. Carriba, P. *et al.* Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* **5**, 727-733 (2008).
6. Gandia, J. *et al.* Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* **582**, 2979-2984 (2008).

7. Davies, A., Gowen, B.E., Krebs, A.M., Schertler, G.F. & Saibil, H.R. Three-dimensional structure of an invertebrate rhodopsin and basis for ordered alignment in the photoreceptor membrane. *J. Mol. Biol.* **314**, 455-63 (2001).
8. Maurel, D. *et al.* Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* **5**, 561-567 (2008).
9. Fotiadis, D. *et al.* Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**, 127-128 (2003).
10. Klco, J.M., Lassere, T.B. & Baranski, T.J. C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 35345-35353 (2003).
11. Liang, Y. *et al.* Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 21655-21662 (2003).
12. Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H. & Javitch, J.A. Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **102**, 17495-17500 (2005).
13. Guo, W. *et al.* Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* **27**, 2293-2304 (2008).
14. González-Maeso J. *et al.* Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**, 93-97 (2008)
15. Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H. & Javitch, J.A. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 688-695.
16. Woods, A.S. & Ferré, S. Amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction. *J. Proteome Res.* **4**, 1397-1402 (2005).
17. Zimmermann, T., Rietdorf, J., Girod, A., Georget, V. & Pepperkok, R. Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair. *FEBS Lett.* **531**, 245-249 (2002).
18. Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351-1362 (1999).
19. Ciruela, F. *et al.* Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. *Anal. Chem.* **76**, 5354-5363 (2004).
20. Azdad, K. *et al.* Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **34**, 972-986 (2009).
21. Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M. & Caron, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189-225 (1998).
22. Murakami, M. & Kouyama, T. Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* **453**, 363-367 (2008).
23. Jackson, S.N., Wang, H.Y. & Woods, A.S. Study of the fragmentation patterns of the phosphate-arginine noncovalent bond. *J. Proteome Res.* **4**, 2360-2363. .
24. Jackson, S.N., Moyer, S.C. & Woods, A.S. The role of phosphorylated residues in peptide-peptide noncovalent complexes formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1535-1541 (2008).
25. Jackson, S.N., Wang, H.Y.J., Yergey, A. & Woods, A.S. Phosphate stabilization of intermolecular interactions. *J. Proteome Res.* **5**, 122-126 (2006).

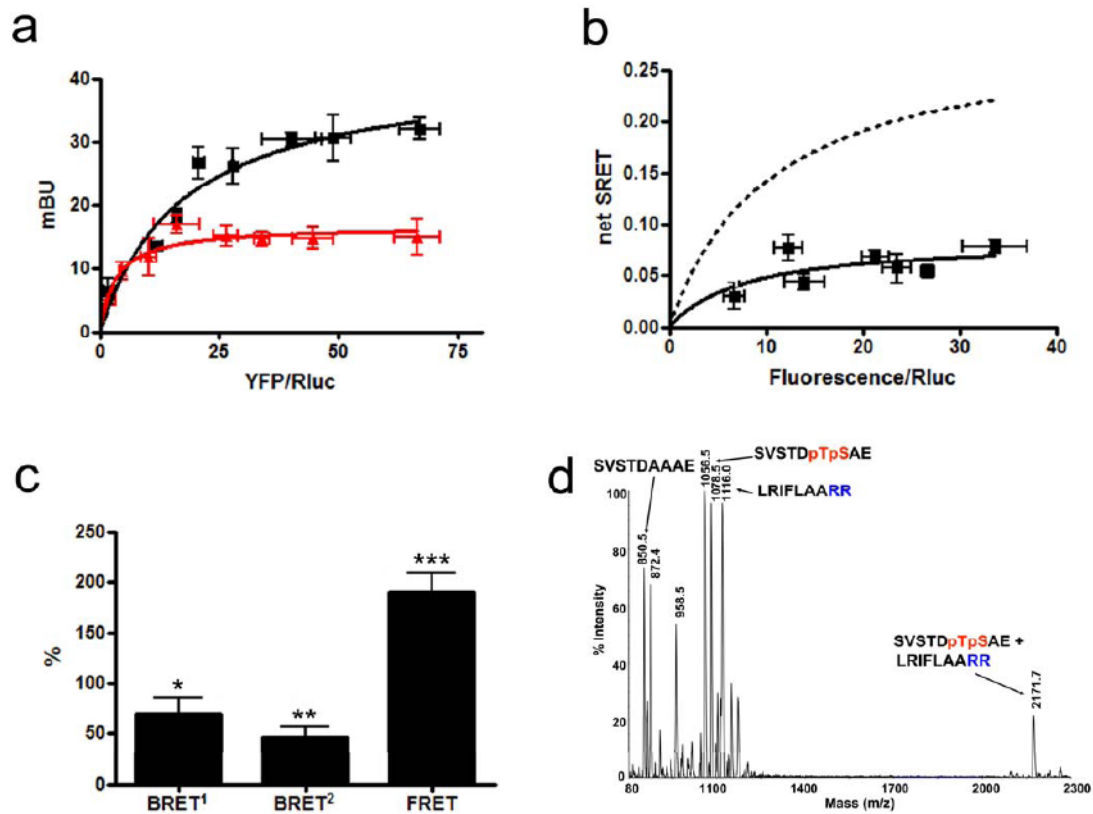
26. Ferré, S., Goldberg, S.R., Lluís, C. & Franco, R. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology* **56** Suppl 1, 226-234 (2009).
27. Ledent, C. *et al.* Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**, 401-404 (1999).
28. Aso, E. *et al.* BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J. Neurochem.* **105**, 565-572 (2008).
29. Jaakola, V.P. *et al.* The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**, 1211-1217 (2008).
30. Cherezov, V. *et al.* High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**, 1258-1265 (2007).
31. Rasmussen, S.G. *et al.* Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383-7 (2007).
32. Ballesteros, J.A. & Weinstein, H. Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors. *Meth. Neurosci.* **25**, 366-428 (1995).
33. Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W. & Ernst, O.P. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**, 183-187 (2008).
34. Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., Villa, C. & Schertler, G.F. Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. *J. Mol. Biol.* **343**, 1409-1438 (2004).

## Figure legends



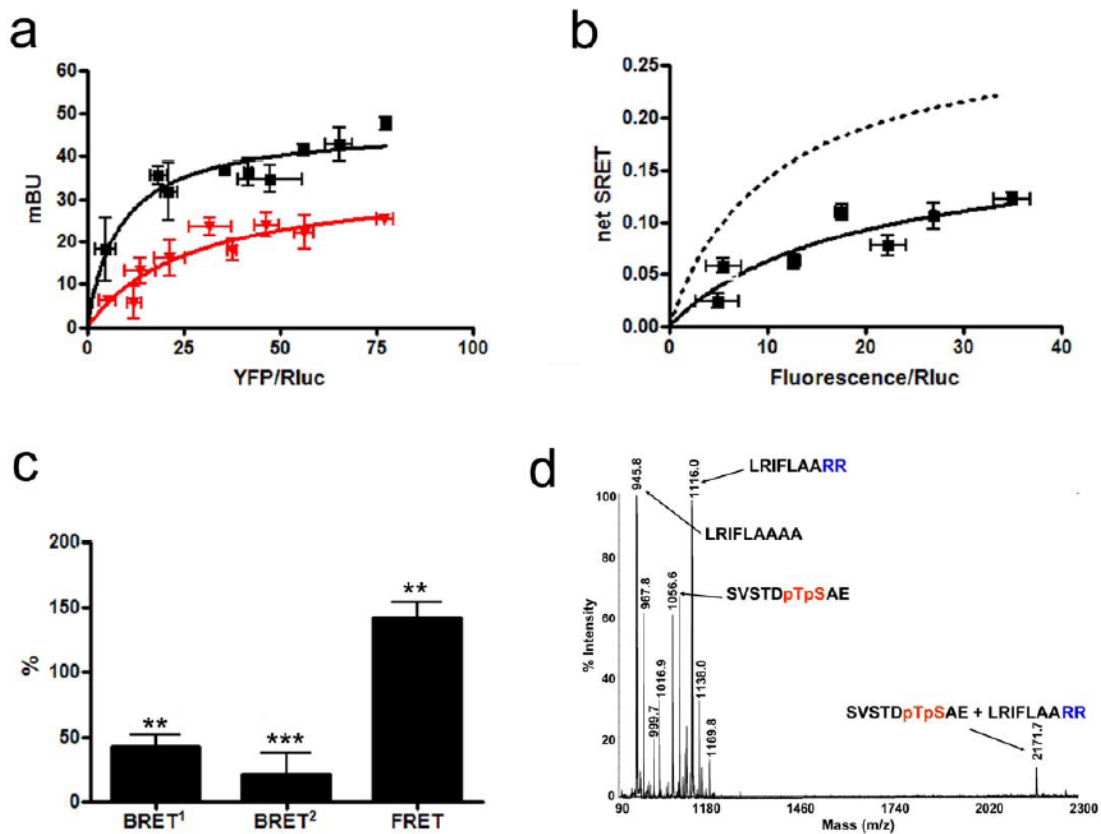
**Fig. 1.  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$  receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units),  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> receptor (3  $\mu$ g of cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of  $CB_1$ -YFP receptor cDNA (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a) and (b) aliquots of these cells were used. In (a), net SRET<sup>2</sup> was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* and  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> receptors. SRET saturation curves (black) were obtained for the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*,  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> and  $CB_1$ -YFP receptors, while negligible and linear SRET was obtained in cells expressing equivalent amounts of  $A_{2A}$ -*Rluc*,  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> and 5HT<sub>2B</sub>-YFP receptors (green) or  $D_4$ -*Rluc*,  $A_{2A}$ -GFP<sup>2</sup> and  $CB_1$ -YFP receptors (red). SRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 to 8 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (b) BRET<sup>1</sup> was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after coelenterazine H addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor. BRET<sup>2</sup> was obtained by monitoring the emission of GFP<sup>2</sup> fluorescence after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* receptors. FRET was measured by monitoring the emission of YFP fluorescence after excitation of GFP<sup>2</sup> at 400 nm. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 to 8 independent experiments performed in duplicate. Linear un-mixing of the emission signals was applied to BRET<sup>2</sup> and FRET values (b) and for YFP quantification in

saturation curves (a). In (c) a schematic representation of the putative triangular quaternary structure of the  $A_{2A}$ -CB $_1$ -D $_2$  receptor heteromer.



**Fig. 2.  $A_{2A}$ -CB $_1^{A467-A468}$ -D $_2$  receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing (a)  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units) and increasing amounts of cDNA of the CB $_1$ -YFP or CB $_1^{A467-A468}$ -YFP receptors (8,000 to 18,000 fluorescence units) or (b and c)  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units), D $_2$ -GFP $^2$  receptor (3  $\mu$ g of the cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of cDNA of the CB $_1^{A467-A468}$ -YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a), BRET $^1$  saturation curves for the  $A_{2A}$ -*Rluc*-CB $_1$ -YFP receptor pair (black) and for the  $A_{2A}$ -*Rluc*-CB $_1^{A467-A468}$ -YFP receptor pair (red) were obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after coelenterazine H addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of BRET $^1$  acceptor. In (b), net SRET $^2$  was obtained by monitoring the emission of YFP fluorescence after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* and D $_2$ -GFP $^2$  receptors. SRET saturation curves (solid line) were obtained for the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*, D $_2$ -GFP $^2$  and CB $_1^{A467-A468}$ -YFP receptors and compared with the curve obtained for

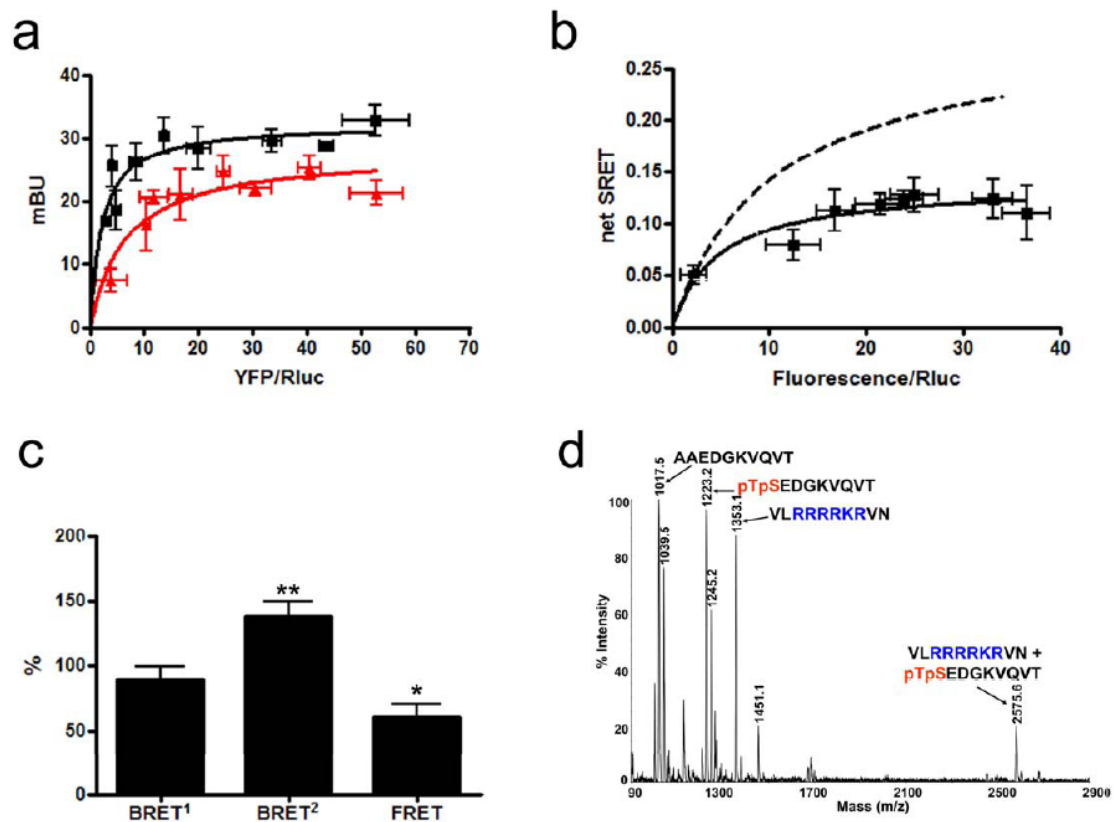
the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*,  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (dotted line, see Fig.1). SRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (c) BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET were measured as indicated in Figure 1 legend. Data are expressed as % of values obtained in cells expressing  $A_{2A}$ -*Rluc*,  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (control, Figure 1b), in mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Bonferroni test showed significant increases or decreases respect to the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ). Linear un-mixing of the emission signals was applied to the data for BRET<sup>2</sup> and FRET values (c) and for YFP quantification in saturation curves (a and b). In (d), the spectrum of a mixture of the following 3 peptides SVSTDAAAE, SVSTDpTpSAE and LRIFLAARR, shows only one non-covalent complex between SVSTDpTpSAE and LRIFLAARR at 2171.7 amu (see text).



**Fig. 3.  $A_{2A}^{A205-A206}$ -CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing (a)  $A_{2A}$ -*Rluc* or  $A_{2A}^{A205-A206}$ -*Rluc* receptors (1 or 0.8  $\mu$ g of cDNA respectively; approximately 100,000 luminescence units) and increasing amounts of the cDNA of the CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units) or (b and c)  $A_{2A}^{A205-A206}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units),  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> receptor (3  $\mu$ g of the cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of cDNA of the CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured

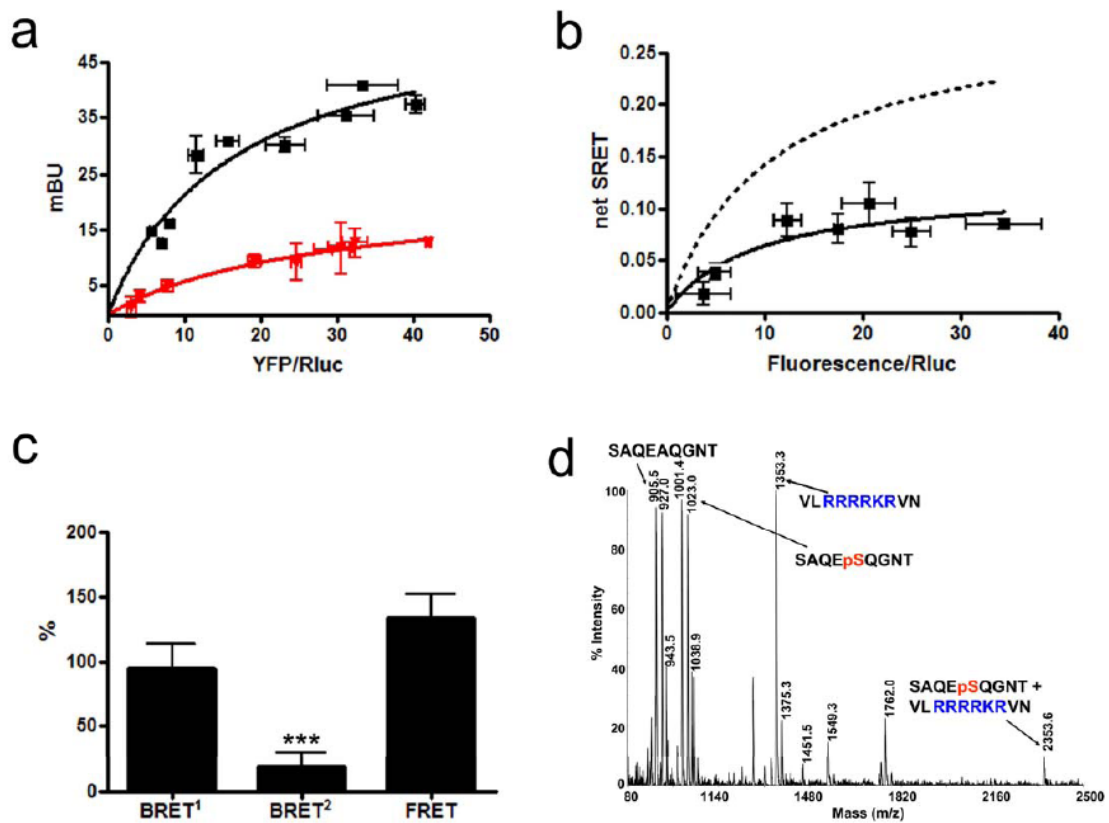


before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a), BRET<sup>1</sup> saturation curves for the A<sub>2A</sub>-*Rluc*-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (black) and for the A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc*-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (red) were obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after coelenterazine H addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of donor. Data are expressed as means ± S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of BRET<sup>1</sup> acceptor. In (b), net SRET<sup>2</sup> was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors. SRET saturation curves (solid line) were obtained for the coupling of A<sub>2A</sub><sup>A205-A206</sup>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors and compared with the curve obtained for the coupling of A<sub>2A</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (dotted line, see Fig.1). SRET data are expressed as means ± S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (b) BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET were measured as indicated in Figure 1 legend. Data are expressed as % of values obtained in cells expressing A<sub>2A</sub>-*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (control, Figure 1b), in mean ± S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Bonferroni test showed significant increases or decreases respect to the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ). Linear un-mixing of the emission signals was applied to the data for BRET<sup>2</sup> and FRET values (c) and for YFP quantification in saturation curves (a and b). In (d), the spectrum of a mixture of the following 3 peptides LRIFLAAA, LRIFLAARR and SVSTDpTpSAE, shows only one NCX between SVSTDpTpSAE and LRIFLAARR at 2171.7 amu (see text).



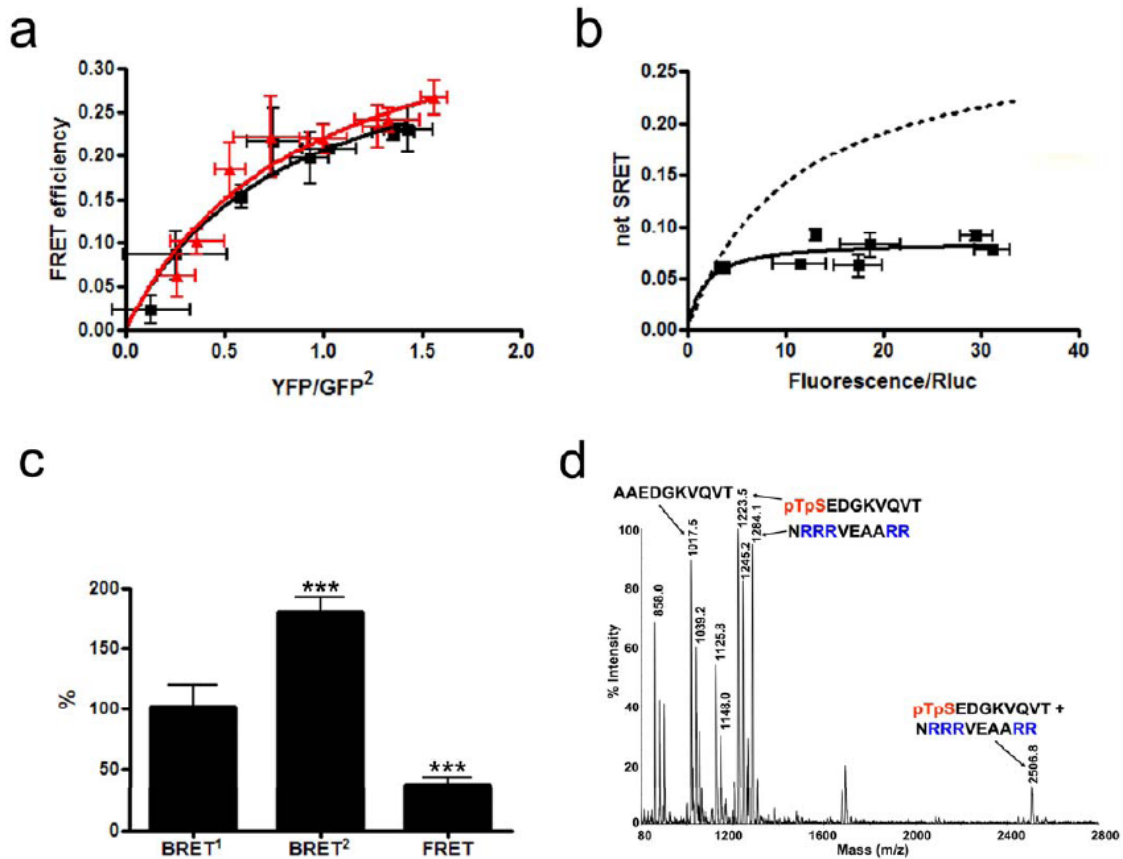
**Fig. 4.  $A_{2A}$ -CB $_1^{A321-A322}$ -D $_2$  receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing (a)  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units) and increasing amounts of the cDNA for CB $_1$ -YFP or CB $_1^{A321-A322}$ -YFP receptors (8,000 to 18,000 fluorescence units) or (b and c)  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units), D $_2$ -GFP $^2$  receptor (3  $\mu$ g of the cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of cDNA of the CB $_1^{A321-A322}$ -YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a), BRET $^1$  saturation curves for the  $A_{2A}$ -*Rluc*-CB $_1$ -YFP receptor pair (black) and for  $A_{2A}$ -*Rluc*-CB $_1^{A321-A322}$ -YFP receptor pair (red) were obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after coelenterazine H addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 6 different experiments grouped as a function of the amount of BRET $^1$  acceptor. In (b), net SRET $^2$  was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}$ -*Rluc* and D $_2$ -GFP $^2$  receptors. SRET saturation curves (solid line) were obtained for the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*, D $_2$ -GFP $^2$  and CB $_1^{A321-A322}$ -YFP receptors and compared with the curve obtained for the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*, D $_2$ -GFP $^2$  and CB $_1$ -YFP receptors (dotted line, see Fig.1). SRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 6 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (c) BRET $^1$ , BRET $^2$  and FRET were measured as indicated in Figure 1b legend. Data are

expressed as % of values obtained in cells expressing  $A_{2A}$ -*Rluc*,  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (control, Figure 1b), in mean ± S.E.M. of 6 independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Bonferroni test showed significant increases or decreases respect to the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ). Linear unmixing of the emission signals was applied to the data for BRET<sup>2</sup> and FRET values (c) and for YFP quantification in saturation curves (a and b). In (d), the spectrum of a mixture of the following 3 peptides AAEDGKVQVT, **pTp**SEDGKVQVT and VLRRRRKRNVN, shows only one NCX between **pTp**SEDGKVQVT and VLRRRRKRNVN at 2575.6 amu (see text).

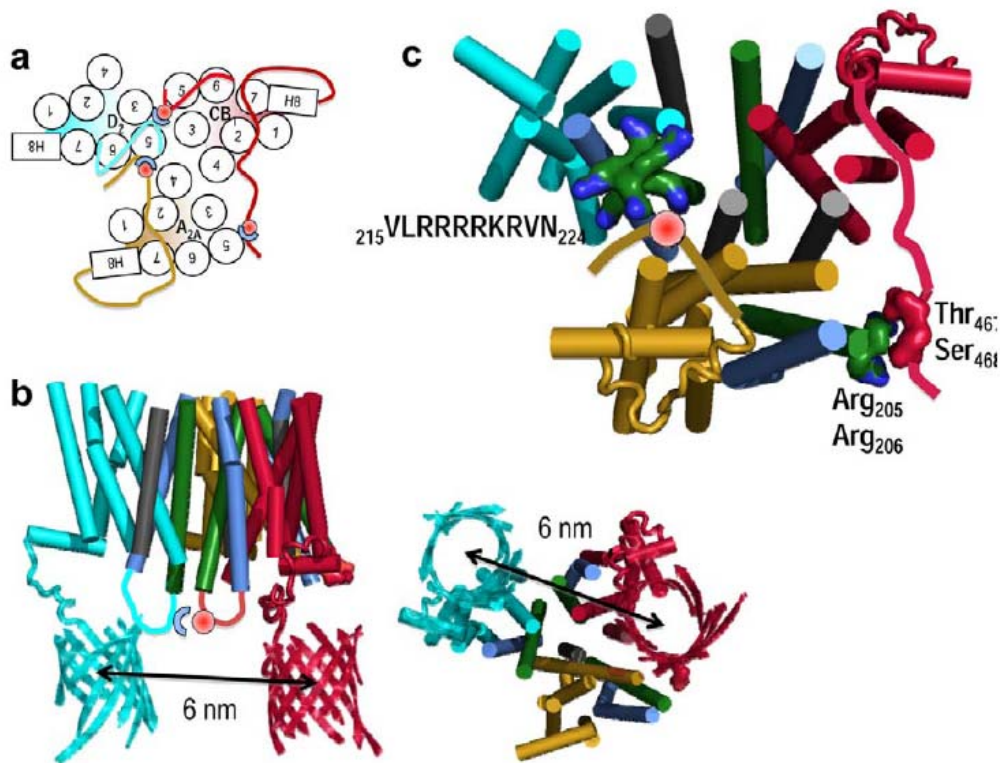


**Fig. 5.  $A_{2A}$ -CB<sub>1</sub>- $D_{2S}$  receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing (a)  $D_{2S}$ -GFP<sup>2</sup> receptor (1,5 µg of cDNA; approximately 5,000 fluorescence units) or  $D_2$ -GFP<sup>2</sup> receptor (2 µg of cDNA; approximately 5,000 luminescence units) and increasing amounts of cDNA of CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units) or (b and c)  $A_{2A}$ -*Rluc* receptor (1 µg of cDNA; approximately 100,000 luminescence units),  $D_{2S}$ -GFP<sup>2</sup> receptor (3 µg of the cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of the cDNA for CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a), FRET saturation curves for the  $D_2$ -GFP<sup>2</sup>-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (black) and for  $D_{2S}$ -GFP<sup>2</sup>-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (red) were obtained by monitoring the YFP fluorescence emission at 530

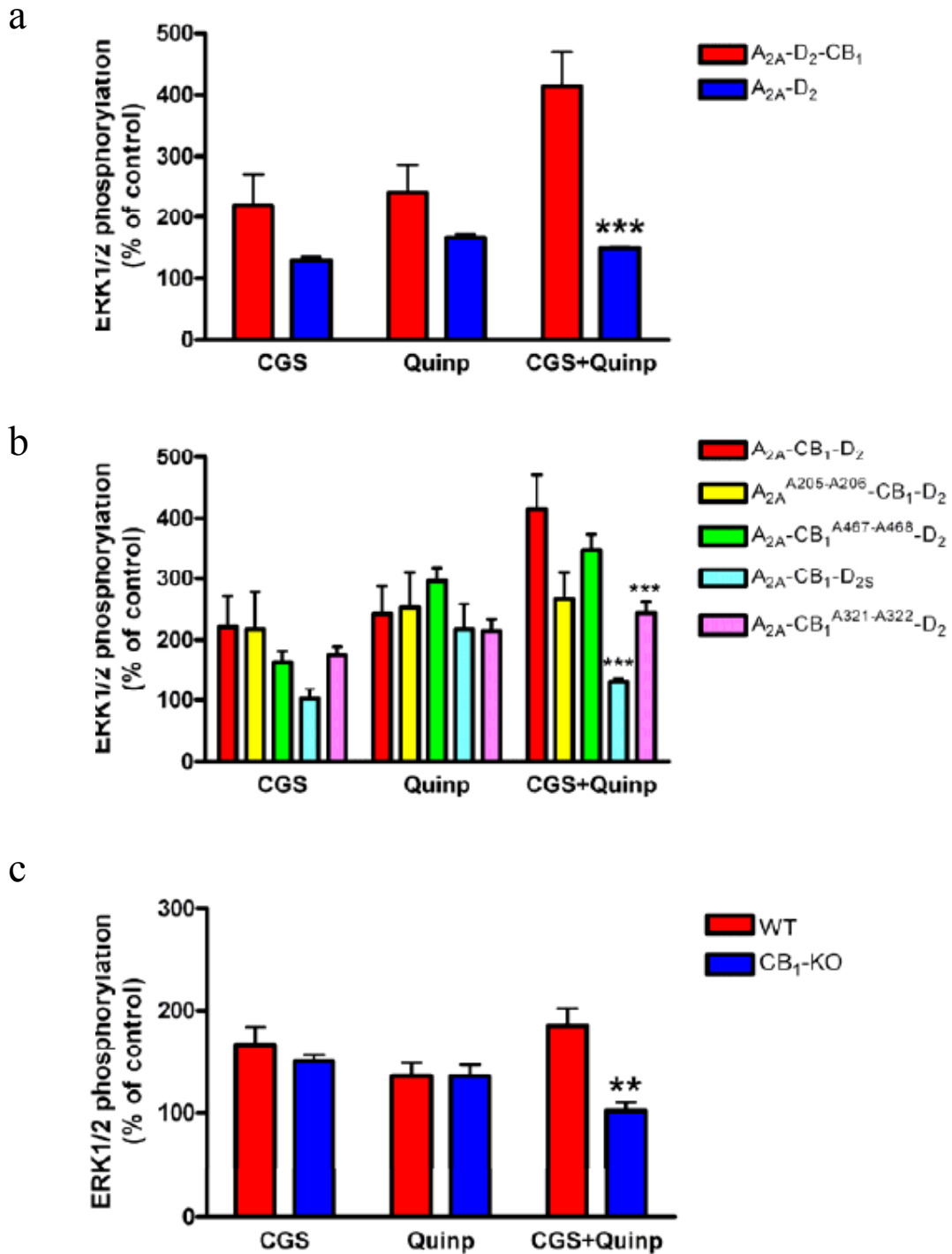
nm after excitation of GFP<sup>2</sup> at 400 nm, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of donor protein. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 7 different experiments grouped as a function of the amount of FRET acceptor. In (b), net SRET<sup>2</sup> was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of A<sub>2A</sub>-Rluc and D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors. SRET saturation curves (solid line) were obtained for the coupling of A<sub>2A</sub>-Rluc, D<sub>2S</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors and compared with the curve obtained for the coupling of A<sub>2A</sub>-Rluc, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (dotted line, see Fig.1). SRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (c), BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET were measured as indicated in Figure 1 legend. Data are expressed as % of values obtained in cells expressing A<sub>2A</sub>Rluc, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (control, Figure 1b), in mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Bonferroni test showed significant increases or decreases respect to the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ). Linear un-mixing of the emission signals was applied to the data for BRET<sup>2</sup> and FRET values (a and c) and for YFP quantification in saturation curves (a and b). In (d), the spectrum of a mixture of the following 3 peptides AAEDGKVQVT, **pTp**SEDGKVQVT and **NRRRVEAARR**, shows only one NCX between **pTp**SEDGKVQVT and **NRRRVEAARR** at 2506.8 amu (see text).



**Fig. 6.  $A_{2A}^{A374}$ -CB<sub>1</sub>D<sub>2</sub> receptor heteromerization in living cells.** Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing (a)  $A_{2A}$ -*Rluc* or  $A_{2A}^{A374}$ -*Rluc* receptors (1 or 0.8  $\mu$ g of cDNA respectively; approximately 100,000 luminescence units) and increasing amounts of cDNA of the CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units) or (b and c)  $A_{2A}^{A374}$ -*Rluc* receptor (1  $\mu$ g of cDNA; approximately 100,000 luminescence units), D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptor (3  $\mu$ g of the cDNA; approximately 6,000 fluorescence units) and increasing amounts of cDNA of CB<sub>1</sub>-YFP receptor (8,000 to 18,000 fluorescence units). In each sample fluorescence or luminescence were measured before every experiment to confirm similar donor expressions while monitoring the increase acceptor expression. In (a), BRET<sup>1</sup> saturation curves for the  $A_{2A}$ -*Rluc*-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (black) and for the  $A_{2A}^{A374}$ -*Rluc*-CB<sub>1</sub>-YFP receptor pair (red) were obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after coelenterazine H addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of donor. Data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of BRET<sup>1</sup> acceptor. In (b), net SRET<sup>2</sup> was obtained by monitoring the YFP fluorescence emission after DeepBlueC addition, with subtraction of the value obtained with cells expressing the same amount of  $A_{2A}^{A374}$ -*Rluc* and D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> receptors. SRET saturation curves (solid line) were obtained for the coupling of  $A_{2A}^{A374}$ -*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors and compared with the curve obtained for the coupling of  $A_{2A}$ -*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP receptors (dotted line, see Fig.1). SRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of 5 different experiments grouped as a function of the amount of SRET acceptor. In (c), BRET<sup>1</sup>, BRET<sup>2</sup> and FRET were measured as indicated in Figure 1 legend. Data are expressed as % of values obtained in cells expressing  $A_{2A}$ -*Rluc*, D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> and CB<sub>1</sub>-YFP (control, Figure 1b), in mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate. One-way ANOVA followed by Bonferroni test showed significant increases or decreases respect to the control (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ). Linear un-mixing of the emission signals was applied to the data for BRET<sup>2</sup> and FRET values (c) and for YFP quantification in saturation curves (a and b). In (d), the spectrum of a mixture of the following 3 peptides SAQEAQGNT, SAQEpSQGNT and VLRRRRKRVN, shows only one NCX between SAQEpSQGNT and VLRRRRKRVN at 2353.6 amu (see text).



**Fig. 7. Molecular model of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer.** (a) A cartoon model of the heteromerization of A<sub>2A</sub> (gold), CB<sub>1</sub> (red), and D<sub>2</sub> (cyan) receptors. Solid lines between TMs 5 and 6 symbolize IL3 of CB<sub>1</sub> (red line, 29 amino acids long) or D<sub>2</sub> (cyan line, 142 amino acids long) receptors, which were not modeled; solid lines after HX 8 represent CT of CB<sub>1</sub> (red line) or A<sub>2A</sub> (golden line), which were arbitrarily modeled as in squid rhodopsin; red spheres represent either phosphorylated Thr<sub>321</sub>(IL3)-Ser<sub>322</sub>(IL3) or Thr<sub>467</sub>(CT)-Ser<sub>468</sub>(CT) of CB<sub>1</sub> or phosphorylated Ser<sub>374</sub>(CT) of A<sub>2A</sub>; and blue half circles represent either Arg<sub>205</sub>(5.66)-Arg<sub>206</sub>(5.67) of A<sub>2A</sub> or the <sup>215</sup>(5.64)VLRRRRKRVN<sub>224</sub> or <sup>266</sup>NRRRV EAARR<sub>275</sub>(IL3) epitopes of D<sub>2</sub>. (b) Lateral and cytoplasmic views of the computational model of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. GFP fused to Cys<sub>443</sub>(CT) of the D<sub>2</sub> receptor (cyan surface) and YFP fused to Leu<sub>472</sub>(CT) of the CB<sub>1</sub> receptor (red surface) are shown. IL3 of CB<sub>1</sub> (red line) and D<sub>2</sub> (cyan line) receptors are shown in solid lines to illustrate their proximity. (c) Cytoplasmic view of the computational model of the A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromer. CT of the CB<sub>1</sub> receptor is depicted in the following manner: amino acids Ser<sub>414</sub>-Asn<sub>437</sub> of (red tube ribbon) are modeled as in the crystal structure of squid rhodopsin, amino acids Asn<sub>437</sub>-Asp<sub>466</sub> (not modeled) are shown as a red solid line to illustrate the position of Thr<sub>467</sub>-Ser<sub>468</sub>, and amino acids Ala<sub>469</sub>-Leu<sub>472</sub> (red solid line) are arbitrarily modeled to position YFP. CT of the A<sub>2A</sub> receptor is depicted in the following manner: amino acids Ser<sub>305</sub>-Gly<sub>328</sub> (golden tube ribbon) are modeled as in the crystal structure of squid rhodopsin, amino acids Ser<sub>329</sub>-Ser<sub>412</sub> (not modeled) are shown as a yellow solid line, and phosphorylated Ser<sub>374</sub> is shown as a red circle. Helices are shown as cylinders with the following color codes: TM4 in gray, TM5 in green, TM6 in blue, and the other helices in yellow for A<sub>2A</sub>, in red for CB<sub>1</sub>, and cyan for D<sub>2</sub> receptors.



**Fig. 8. Agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation by the  $A_{2A}-D_2-CB_1$  receptor heteromer.** (a and b) Assays were performed 48 h post-transfection in cells expressing the indicated receptors (1.2  $\mu$ g of cDNA of the  $A_{2A}$  or the  $A_{2A}^{A205-A206}$  receptors, 1  $\mu$ g of cDNA of the  $D_2$ , 0.8  $\mu$ g of cDNA of the  $D_{2S}$  receptor and 1  $\mu$ g of cDNA of the  $CB_1$ ,  $CB_1^{A467-A468}$  or the  $CB_1^{A321-A322}$  receptors). Cells were treated for 5 min with 200 nM CGS 21680 (CGS), 1  $\mu$ M quinpirole (Quinp) or both (CGS+Quinp) and ERK1/2

phosphorylation was determined as indicated in Materials and Methods. The immunoreactive bands from 4 experiments performed in duplicates were quantified and the values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of % of phosphorylation relative to the basal levels found in untreated cells. In (c), assays were performed in striatal slices from wild-type (WT) or CB<sub>1</sub> knockout mice (CB<sub>1</sub>-KO). The slices were treated for 10 min with 1  $\mu$ M CGS 21680 (CGS), 1  $\mu$ M quinpirole (quinpirole) or both and ERK1/2 phosphorylation was determined as indicated in Materials and Methods. The immunoreactive bands from 4 to 8 slices obtained from 5 to 9 animals were quantified and values represent the mean  $\pm$  S.E.M. of the % of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. Significant differences respect to the wild-type mice were calculated by bifactorial ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests (\*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ ).



### 3.4 Interacciones entre la calmodulina y los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> y dopamina D<sub>2</sub>

Gemma Navarro, María S. Aymerich, Daniel Marcellino, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Luigi Agnati, Amina S. Woods, Kjell Fuxe, Carme Lluís, José Luís Lanciego, Sergi Ferré y Rafael Franco

Manuscrito publicado en *Journal of Biological Chemistry* 2009 Oct 9;284(41):28058-68.

La proteína de unión de calcio, calmodulina (CaM), es capaz de unirse directamente a ciertos dominios citoplasmáticos de algunos receptores acoplados a proteína G (GPCR), incluyendo el receptor D<sub>2</sub> de dopamina. La calmodulina se une a la porción N-terminal del largo tercer bucle intracelular del receptor D<sub>2</sub> de dopamina, en un epítipo rico en argininas que también se encuentra implicado en la unión a la proteína G<sub>i/o</sub> y al receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, en la formación del heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>. En este estudio, mediante el uso de técnicas de proteómica y de BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*), se muestran evidencias de la interacción de la calmodulina con el receptor A<sub>2A</sub>. Además, utilizando las técnicas de BRET y SRET (*sequential resonance energy transfer*) se han obtenido evidencias de la formación de oligómeros de receptores A<sub>2A</sub>-CaM-D<sub>2</sub>. Estudios de competencia de BRET indican que en el heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> la calmodulina se une preferentemente a un epítipo próximo al extremo C-terminal del receptor A<sub>2A</sub>. Por otro lado, se han detectado cambios conformacionales en el oligómero de receptores A<sub>2A</sub>-CaM-D<sub>2</sub> inducidos por calcio y se ha visto que el calcio modula de forma selectiva la señalización vía MAPK de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> en el heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>. Estos resultados pueden tener implicaciones en desórdenes de los ganglios basales debido a que los heterómeros de receptores A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> están siendo considerados como objetivo en el desarrollo de agentes antiparkinsonianos.



### 3.5 La autoadministración de cocaína por periodos largos incrementa la expresión de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina en el núcleo accumbens que revierte durante los periodos de abstinencia

Daniel Marcellino, David C. Roberts, Gemma Navarro, M. Filip, Carmen Lluís, Rafael Franco y Kjell Fuxe

Manuscrito publicado en *Brain Research* 2007 Apr 27,1143:208-20.

Se han estudiado los efectos de la autoadministración de cocaína y su síndrome de abstinencia sobre las características de unión y los niveles de expresión de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> en el núcleo accumbens y en el estriado dorsal anterior y posterior de rata (*rattus norvegicus*). Se han utilizado técnicas bioquímicas de unión de radioligandos como el antagonista del receptor D<sub>2</sub> [(3)H]-Raclopride y el antagonista del receptor A<sub>2A</sub> [(3)H]-ZM 241385 y técnicas de inmunodetección para estudiar la expresión de los receptores. Se ha observado un aumento significativo en la expresión del receptor funcional A<sub>2A</sub> pero no del receptor funcional D<sub>2</sub> en el núcleo accumbens inmediatamente después de 10 días de autoadministración de cocaína que volvió al nivel basal después de 7 días de retirada de la cocaína. Por el contrario, en el estriado dorsal posterior se observaron reducciones significativas en los niveles de inmunodetección del receptor A<sub>2A</sub> inmediatamente después de la autoadministración de cocaína, asociados a una tendencia a la reducción de los centros de unión del antagonista del receptor A<sub>2A</sub>. En los animales sometidos a abstinencia, se detectaron incrementos significativos en la densidad y en los valores de K<sub>d</sub> de los centros de unión del antagonista del receptor D<sub>2</sub> en el núcleo accumbens, aunque no se detectaron cambios en los niveles de expresión del receptor D<sub>2</sub>, sugiriendo una sobreexpresión de los receptores D<sub>3</sub> en esta región. El incremento del receptor A<sub>2A</sub> en el núcleo accumbens inducido por cocaína puede representar una *up-regulation* para compensar los incrementos en los niveles de señalización de los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> inducidos por la cocaína, que desaparecen a los 7 días de retirada de cocaína, viéndose incrementados los efectos de refuerzo de la cocaína. Por lo tanto, los agonistas del receptor A<sub>2A</sub> pueden considerarse como antagonistas de la cocaína y ser utilizados en el tratamiento de esta adicción debido a su antagonización en la señalización de los heterómeros A<sub>2A</sub>/D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>/D<sub>3</sub>.



### 3.6 La unión de la cocaína al receptor sigma-1 en el heterómero de receptores D<sub>1</sub>-sigma-1 modula la función del receptor D<sub>1</sub> de dopamina

Gemma Navarro, Estefanía Moreno, Marisol Aymerich, Daniel Marcellino, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Enric I. Canela, Jordi Ortiz, Kjell Fuxe, Carmen Lluís, Sergi Ferré y Rafael Franco

Manuscrito en preparación para ser enviado.

En este estudio se describe un nuevo mecanismo mediante el cual la cocaína modula la función de los receptores D<sub>1</sub> de dopamina. Mediante el uso de técnicas basadas en la transferencia de energía bioluminiscente se ha demostrado, por primera vez, la capacidad de los receptores sigma-1 para heteromerizar con homómeros de receptores D<sub>1</sub> de dopamina en células vivas. De acuerdo con una interacción molecular entre ambos receptores, la coexpresión de los receptores sigma-1 y dopamina D<sub>1</sub> provoca una alteración de la distribución subcelular del receptor sigma-1 que se ve potenciada con la cocaína. La unión de la cocaína a los receptores sigma-1 provoca cambios estructurales en el heterómero y aumenta fuertemente la producción de AMPc inducida por los agonistas del receptor D<sub>1</sub>. La unión de la cocaína al receptor sigma-1 o la unión de agonistas al receptor D<sub>1</sub> induce la fosforilación de ERK1/2 y este efecto se ve revertido tanto por antagonistas del receptor sigma-1 como del receptor D<sub>1</sub>. Se observa un *cross-talk* negativo entre la cocaína y el agonista del receptor D<sub>1</sub> en la fosforilación de ERK1/2 en células vivas y en *slices* de estriado de ratón. Este efecto es debido al receptor sigma-1, ya que no se observa en células tratadas con ARNi para el receptor sigma-1 o en ratones *KO* para el receptor sigma-1. En conjunto, estos resultados demuestran que la cocaína puede ser capaz de modular la transmisión dopaminérgica mediada por el receptor D<sub>1</sub>, mediante la interacción con una de sus proteínas de unión, el receptor sigma-1. Estos resultados introducen una nueva perspectiva para entender las bases moleculares involucradas en la adicción a cocaína.



# Cocaine binding to sigma-1 receptors in the dopamine D<sub>1</sub>-sigma-1 receptor heteromer modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function

**Gemma Navarro<sup>1</sup>; Estefanía Moreno<sup>1</sup>; María S. Aymerich<sup>2</sup>; Daniel Marcellino<sup>3</sup>; Josefa Mallol<sup>1</sup>; Antoni Cortés<sup>1</sup>; Vicent Casadó<sup>1</sup>; Enric I. Canela<sup>1</sup>; Jordi Ortiz<sup>4</sup>; Kejell Fuxe<sup>3</sup>; Carmen Lluís<sup>1</sup>; Sergi Ferré<sup>5</sup> and Rafael Franco<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Avda. Pio XII 55, 31008 Pamplona, Spain. <sup>3</sup>Department of Neuroscience, Karolinska Institute, 17177, Stockholm, Sweden. <sup>4</sup>Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology Fac. Medicin, Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>5</sup>National Institut on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 251 Bayview Blvd., Baltimore, Maryland, 21224, USA.

## ABSTRACT

A new mechanism by which cocaine modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function is described. By using bioluminescence resonance energy transfer based techniques it was demonstrated, for the first time, the ability of sigma-1 receptors to heteromerize with dopamine D<sub>1</sub> receptors homomers in living cells. According with a molecular interaction between both receptors, the co-expression of sigma-1 and dopamine D<sub>1</sub> receptors results in an alteration of sigma-1 subcellular distribution that was potentiated by cocaine. Cocaine binding to sigma-1 receptors induced structural changes in the heteromer and robustly enhanced the dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist-induced cAMP. The cocaine binding to sigma-1 receptors or agonist binding to dopamine D<sub>1</sub> receptor induced ERK1/2 phosphorylation that is equally reverted by antagonists of sigma-1 or dopamine D<sub>1</sub> receptors. A negative relationship between cocaine and dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist in ERK 1/2 phosphorylation was observed in both living cells and mouse striatal slices that was mediated by sigma-1 receptors since it was not observed in cells treated with RNAi for sigma-1 receptors or in sigma-1 receptor knockout mice. Overall these results demonstrate that cocaine might be able to modulate D<sub>1</sub> receptor-mediated dopaminergic transmission by interacting with one of its binding protein, sigma-1 receptor, and introduce a new perspective to understand the molecular basis involved in cocaine addiction.

## INTRODUCTION

The striatum is the main input structure of the basal ganglia, which are subcortical structures involved in the processing of information related with the performance and learning of complex motor acts and in drug addiction. Cocaine intake elevates dopamine levels in areas such as the nucleus accumbens, which has been shown to be a preferential anatomical substrate for reward (Koob, 2006; Di Chiara and Bassareo, 2007). Thus, cocaine exploits the dopaminergic system to elicit part of their behavioral and cellular effects (De Mei et al., 2009). Earlier studies have suggested that the presynaptic dopamine transporter (DAT) is the primary target for cocaine effects (Ritz et al., 1987; Giros et al., 1996; Chen et al., 2006). DAT mediates reuptake of dopamine from the synaptic cleft and thereby controls the termination of dopaminergic signaling (Torres et al., 2007; Bertolino et al., 2009). Cocaine is a high-affinity inhibitor of DAT and the molecular determinants involved in the cocaine binding to DAT have been studied (Beuming et al., 2008; Huang et al., 2009). Cocaine binding to DAT causes a rapid increase in extracellular dopamine levels that produce the reinforcing effects leading to cocaine abuse. Dopamine interacts with membrane receptors that belong to the G-protein coupled receptor family. Thus, upon drug intake, dopamine signaling, controlled by any of the five dopamine receptors, is strongly activated leading to stimulation or inhibition of pathways regulated by the D<sub>1</sub>-like receptors family that include D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors and D<sub>2</sub>-like receptors family that include D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> receptors (Neve et al., 2004), which translates into activation/inhibition of specific neurons and circuitries (Tan et al., 2003). GABAergic striatal efferent neurons constitute more than 95% of the striatal neuronal population (Gerfen, 2004). There are two subtypes of GABAergic striatal efferent neurons: GABAergic dynorphinergic neurons, which express the peptide dynorphin and dopamine D<sub>1</sub> receptors and GABAergic enkephalinergic neurons, which express the peptide enkephalin and dopamine D<sub>2</sub> receptors (Gerfen, 2004). Glutamate and dopaminergic antagonists abolish the transcriptional activation of immediate early genes induced by cocaine (Konradi, 1989; Valjent et al., 2005). The activation of dopamine D<sub>1</sub> receptors is an absolute requirement for the induction of the cellular and behavioral response to cocaine, as demonstrated by studies performed in D<sub>1</sub> receptor knockout mice (Xu et al., 1994). These results are supported by studies using transgenic mice in which dopamine D<sub>1</sub> or D<sub>2</sub> receptors containing GABAergic neurons are visualized by the expression of fluorescent proteins, showing that the acute cellular response to cocaine mostly engage D<sub>1</sub> receptor-expressing, but not D<sub>2</sub> receptor-expressing neurons (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Nevertheless, recent studies also point out the role of both presynaptic and postsynaptic dopamine D<sub>2</sub> receptors in the cocaine-induced effects (De Mei et al., 2009).

Repeated cocaine treatment causes an up-regulation of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-signaling pathway within the nucleus accumbens mediated by dopamine D<sub>1</sub> receptors, resulting in a deregulation of balanced D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> dopamine-like receptor signaling (Anderson and Pierce, 2005). In addition to this, recent reports indicate that the cellular mediator dopamine-



and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa (DARPP-32) and transcription regulator  $\Delta$ FosB are associated with the accumbal PKA pathway to modulate the development of behavioral sensitization (Chen et al., 2009). Cocaine addiction results in part from the distortion of dopamine controlled plasticity, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) plays an important role in the underlying molecular mechanisms of this process (Girault et al., 2007). ERK is activated by cocaine in a subset of neurons in reward-related brain regions in mice exposed to cocaine intake (Lu et al., 2006; Girault et al., 2007). This activation depends upon dopamine D<sub>1</sub> and glutamate receptors. In the long term actions of cocaine, ERK-dependent signaling might represent an integration point between glutamatergic inputs from cortical and limbic regions and dopaminergic inputs (mainly D<sub>1</sub>-like receptor-dependent) from mesolimbic nuclei in the striatonigral pathway, and its concomitant activation by these two distinct inputs might create a “permissive” state for behaviorally salient plasticity. This model requires the action of Ras-GRF1 located in close proximity to the plasma membrane, to simultaneously “sense” both stimuli and to provide a tight regulation of the downstream ERK cascade at the input level (Fasano et al., 2009).

Not all cocaine effects are mediated by a dopamine increase derived by the cocaine inhibition of DAT. Indeed, cocaine interacts with many proteins, and it is now well-established that cocaine interacts with sigma-1 receptors at physiologically relevant concentrations (Matsumoto et al., 2003). In fact, reducing brain sigma-1 receptor levels with antisense oligonucleotides attenuates the convulsive and locomotor stimulant actions of cocaine (Matsumoto et al., 2001, 2002) and antagonists for sigma-1 receptors have also been shown to mitigate the actions of cocaine in animal models (Matsumoto et al., 2003). Although originally proposed as a subtype of opioid receptors, the sigma-1 receptor is now confirmed to be a non-opioid receptor that binds diverse classes of psychotropic drugs (Hayashi and Su, 2005). A topology model was proposed where the sigma-1 receptor may have two transmembrane domains near the N-terminus and the center of the protein, whereas both the N- and the C-termini are cytosolic and reside on the endoplasmic reticulum membranes (Hayashi and Su, 2005). Sigma-1 receptors are highly expressed in the brain (Alonso et al., 2000; Hayashi and Su, 2005). On focusing on the caudate-putamen and nucleus accumbens, two key brain regions that mediate the long-term effects of cocaine, it was demonstrated that repeated cocaine administration induces changes in the expression of sigma-1 receptor, via dopamine D<sub>1</sub> receptors. (Zhang et al., 2005). Its association with neurons is well established (Maurice et al., 2001b). Sigma-1 receptors form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum (Hayashi and Su, 2003a, 2003b). The exact biological activity of the sigma-1 receptors is not well known. These receptors bind *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) that is a hallucinogen found endogenously in human brain (Su et al., 2009). The actions mediated by sigma-1 receptors ligands are typically modulatory; they show no pharmacological action *per se*, but exhibit modulatory actions when K<sup>+</sup> channels, NMDA receptors or IP<sub>3</sub> receptors are activated (Hayashi and Su, 2005). Recent studies demonstrated that acute

administration of sigma-1 ligands *per se* can cause a peculiar biochemical action; that is, the sigma-1 receptor translocation from the endoplasmic reticulum to the periphery of cells. Translocation of sigma-1 receptors requires merely sigma-1 ligands, but not activation of other receptors and channels. Thus, this direct biochemical response to sigma-1 ligands may be one of the mechanisms underlying acute actions of ligands (Hayashy and Su, 2005). It is interesting to note that there was any described relationship between cocaine binding to sigma-1 receptors and cocaine effects on dopaminergic transmission. Here, by using bioluminescent resonance energy transfer based techniques, we reported, for the first time, a molecular interaction between sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptors in living cells. Cocaine binding to sigma-1 receptors in a heteromer constituted by a minimum of dopamine D<sub>1</sub> receptor homodimer and sigma-1 receptor, promoted structural changes in the dopamine D<sub>1</sub> receptor homomer and an increase in the dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated cAMP production. We have also observed that cocaine binding to sigma-1 receptors is also able to modulate the dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated ERK 1/2 phosphorylation in living cells and in mouse brain striatal slices.

## MATERIALS AND METHODS

### Drugs.

Cocaine hydrochloride (provided by Alcaliber S.A., Madrid and authorized by *La Agencia Española del Medicamento, del Ministerio de Sanidad y Consumo*) was solved in Dulbecco's modified Eagle's medium.

### Cell Culture.

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 5% (v/v) heat inactivated Foetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). CHO cell lines were maintained in  $\alpha$ -MEM medium without nucleosides, containing 10% fetal calf serum, 50  $\mu$ g/mL penicillin, 50  $\mu$ g/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (300  $\mu$ g/mL). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, and were passaged when they were 80-90% confluent, i.e. approximately twice a week.

### Fusion Proteins and Expression Vectors

Full length YFP was subcloned in the XhoI site of pcDNA3.1 vector (Invitrogen). The N-terminal truncated version of YFP, named nYFP (amino acids 1 to 155), was made by PCR amplification and cloning into the XhoI site of pcDNA3.1 using the following primers: FnYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') and RnYFP (5'-CCGTCTAGATCAGGCCATGATATAGACGTTG-3'). Also, a C-terminal truncated version of YFP, named cYFP (amino acids 155 to 231), was made

using the same strategy and the following primers: FcYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGACAAGCAGAAGAACGGC-3') and RcYFP (5'-CCGTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'). The human cDNA for the dopamine D<sub>1</sub>, adenosine A<sub>1</sub>, GABAB<sub>2</sub> or the sigma-1 receptors cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring either unique *EcoRI* and *KpnI* sites (or *EcoRI* and *BamHI* sites for adenosine A<sub>1</sub> receptor). The fragments were then subcloned to be in-frame with *Rluc* into the *EcoRI* restriction site of a *Renilla* luciferase-expressing vector (p*Rluc*-N1) (PerkinElmer, Wellesley, MA), or into the *EcoRI* and *KpnI* or *BamHI* restriction site of the variant of GFP (EYFP-N3; enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany), to give the plasmids that express D<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, GABAB<sub>2</sub> or sigma-1 receptors fused to either *Rluc* or YFP on the C-terminal end of the receptor (D<sub>1</sub>-*Rluc*, D<sub>1</sub>-YFP, sigma-1-*Rluc*, sigma-1-YFP, A<sub>1</sub>-*Rluc*, A<sub>1</sub>-YFP or GABAB<sub>2</sub>-*Rluc* receptors). The human cDNA for D<sub>1</sub> receptor cloned in pcDNA3.1 was amplified without its stop codon using sense and antisense primers harboring unique *NheI* and *BamHI* sites to clone D<sub>1</sub> receptor in pcDNA3.1-cYFP or pcDNA3.1-nYFP. The amplified fragments were subcloned to be in-frame with the multiple cloning sites of the vectors to give the plasmids that express D<sub>1</sub> receptors fused to either nYFP or cYFP on the C-terminal end of the receptor (D<sub>1</sub>-cYFP and D<sub>1</sub>-nYFP). When analysed by confocal microscopy, it was observed that all fusion proteins showed similar subcellular distribution than naïve receptors (results not shown). Fusion of *Rluc* and YFP to dopamine D<sub>1</sub> receptors did not modify receptor function as previously determined by cAMP assays (Ferrada et al., 2009).

### **Transient Transfection and Protein determination.**

HEK-293T or CHO cells growing in 6-well dishes were transiently transfected with the corresponding fusion protein cDNAs by PEI (PolyEthylenImine, Sigma, Steinheim, Germany) method or the corresponding RNAi by lipofectamine (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, USA) method. Human and chine hamster sigma-1 RNAi and scrambled RNAi were designed and synthesized by Invitrogen (cat n°: HSS 145543). Cells were incubated with the corresponding cDNA, 5.47 mM (in nitrogen residues) PEI and 150 mM NaCl or the corresponding RNAi and 0.5 mM lipofectamine, in a serum-free medium. After 4 hours cells were placed in a fresh complete culture medium. Forty-eight hours after transfection, cells were rapidly washed twice in HBSS containing 10 mM glucose, detached, and resuspended in the same buffer. To control for cell number, sample protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin as reference. Cell suspension (20 µg of protein) was distributed into 96-well black plates with a transparent bottom for fluorescence determinations or white plates with white bottom for BRET experiments.

### **Immunostaining.**

For immunocytochemistry, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the

aldehyde groups. Then, after permeabilization with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were treated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, cells were labeled with the primary mouse monoclonal anti-sigma-1 receptor antibody (1/200, Chemicon, Billerica, MA, USA) or with the primary rat anti-D<sub>1</sub> receptor antibody (1/200, Chemicon, Billerica, MA, USA) for 1 h, washed, and stained with the secondary Cyn3 donkey anti-mouse antibody (1/100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA) or Cyn2 goat anti-rat antibody (1/100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, USA) D<sub>1</sub> receptors fused to YFP protein were detected by their fluorescence properties. Samples were rinsed and observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Heterodimers of receptors fused to complementary fragments of YFP were detected directly by their fluorescence properties using a Zeiss 510 Meta confocal microscope.

### RT-PCR

Total cellular RNA was isolated from confluent cultures of HEK-293T or CHO cells using QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Biosciences) following manufacture's instructions. For the RT-PCR assay, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed by random priming using M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant, following the protocol of Two-Step RT-PCR provide by data sheet of Promega (Promega, Madison, WI, USA). The resulting single-stranded cDNA was used to perform PCR amplification for sigma-1 receptor, DAT and GAPD as an internal control of PCR technique. Samples, composed by master mix, that includes *Taq* DNA Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> and reaction buffers at optimal concentrations for efficient amplification of DNA templates (Promega), primers and cDNA, were denatured at 95°C for 2 minutes, and then subjected to 30 cycles of 95°C for 45 seconds, 60°C to annealing sigma-1 receptor primers and 60°C to annealing DAT primers during 30 seconds and extensions of 30 seconds at 70°C, with a 5 minutes extension at 70°C during the last cycle on a Techne thermal cycler. Common primers to amplify human and chinees hamster sigma-1 receptor gene were used: 5'-CCTGGCTGTCGCAGCGGTGCTG-3' (forward) and 5'-GGTGCCAGAGATGATGGTATCC-3' (reverse). To amplify human and chinees hamster DAT the primers used were 5'-TTCATCATCTACCCGGAAGC-3' (forward) and 5'-CACCATAGAACCAGGCCACT-3' (reverse). To amplify human GAPD the primers used were 5'-TTCATCATCTACCCGGAAGC-3' (forward) and 5'-CACCATAGAACCAGGCCACT-3' (reverse) and to amplify chinese hamster GAPD the primers used were 5'-TTCATCATCTACCCGGAAGC-3' (forward) and 5'-CACCATAGAACCAGGCCACT-3' (reverse). The expected size of the amplifications was 350 bp for the sigma-1 receptor, 270 bp for DAT and 330 bp for human and chinese hamster GAPD. The PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel. RNA without reverse transcriptions did not yield any amplicons, indicating that there was no genomic DNA contamination.

## **Fluorescence measurements.**

To quantify fluorescence, cells (20 µg protein) were distributed in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and fluorescence was read in a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, DLReady, Germany) using a 10 nm bandwidth excitation and emission filters at 485 and 530 nm, respectively. Protein-fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells that were not transfected.

## **BRET assays**

HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for the receptor fused to *Rluc* protein and with increasingly amounts of cDNA corresponding to the receptor fused to YFP protein. The equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96-well microplates to measure fluorescence as indicated above. For BRET measurements, the equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom) and 5 µM coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. After 1 minute of adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440-500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510-590 nm). To quantify D<sub>1</sub>-*Rluc* expression, luminescence readings were performed 10 minutes after the addition of 5 µM coelenterazine H. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-*Cf* where *Cf* corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the *Rluc* construct expressed alone in the same experiment.

## **BRET assays with bimolecular fluorescence complemented proteins.**

HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for sigma-1-*Rluc* or GABAB<sub>2</sub>-*Rluc* receptors and with increasingly equal amounts of cDNA corresponding to D<sub>1</sub> receptors fused to one of the two complementary parts of the YFP protein (D<sub>1</sub>-nYFP and D<sub>1</sub>-cYFP). The equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96-well microplates to measure fluorescence as indicated above. The equivalent of 20 µg of cell suspension were distributed in 96-well microplates and 5 µM coelenterazine H was added. After 1 minute delay, collection of readings started using a Mithras LB 940, as described above. To quantify the protein-*Rluc* expression luminescence readings were performed after 10 minutes of adding 5 µM coelenterazine H. The net BRET is defined as described above.

## **cAMP determination.**

CHO cells were grown in 25 cm<sup>2</sup> flasks to 80% confluence and incubated in serum-free medium for 16 h before the experiment. Cells were pre-incubated with 50 µmol·L<sup>-1</sup> zardaverine (a phosphodiesterase inhibitor; Tocris) for 10 min at 37°C and treated for 10 min with the indicated concentrations of D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 (Sigma) in the absence or presence of 150 µM cocaine or

with cocaine alone. To stop the reaction, cells were placed on ice and washed with ice-cold phosphate-buffered saline. Cells were incubated with 200  $\mu$ l of HClO<sub>4</sub> (4%) for 30 min, 1.5 mol·L<sup>-1</sup> KOH was added to reach neutral pH, and samples were centrifuged. The supernatants were frozen at -20°C. The accumulation of cAMP was measured with cyclic AMP (<sup>3</sup>H) assay system (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) as described in the manual from the manufacturer.

### **ERK phosphorylation assays**

Brains from wild-type littermates and sigma-1 receptor knock out CD1 albino Swiss male mice (8 weeks old, 25 g of weight) were generously provided by Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain). Brains were rapidly removed from animals and placed in ice-cold oxygenated (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:95%/5%) Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose and 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4). The brains were sliced at 4°C in a brain matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA.) into 0.5 mm coronal slices. Slices were kept at 4°C in Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer during the dissection of the striatum. Each slice was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer. The temperature was raised to 23°C and after 30 min, the media was replaced by 2 ml Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer (23°C). The slices were incubated under constant oxygenation (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>:95%/5%) at 30°C for 4-5 h in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA). The media was replaced by 200  $\mu$ l of fresh Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer and after 30 min the indicated concentrations of cocaine and/or D<sub>1</sub> receptor ligands, prepared in Krebs-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer, were added. After the indicated incubation period, solution was discarded and slices were frozen on dry ice and stored at -80°C. When ERK phosphorylation assays were performed in cell cultures, CHO cells (48 h after transfection) were cultured in serum-free medium for 16 h before the addition of any agent. Cells were treated with the indicated concentration of cocaine or/and D<sub>1</sub> receptor ligands for the indicated time and washed with ice-cold phosphate-buffered saline. Both, cells and slices were lysed by the addition of 500  $\mu$ L of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20  $\mu$ M phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO<sub>4</sub> and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C and the protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standards. To determine the level of ERK1/2 phosphorylation, equivalent amounts of protein (10  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on a denaturing 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes. The membranes were then probed with a mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (Sigma, 1:2500). In order to rule out that the differences observed were due to the application of unequal amounts of lysates, PVDF blots were stripped and probed with a rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both, phosphorylated and non-phosphorylated ERK1/2 (Sigma, 1:40000). Bands were visualized by the addition of anti-mouse HRP conjugated (Dako, Glostrup, Denmark) or anti-rabbit HRP conjugated (Sigma) secondary

antibodies, respectively, and SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Bands densities were quantified with a LAS-3000 (Fujifilm) and the level of phosphorylated ERK1/2 isoforms was normalized for differences in loading using the total ERK protein band intensities. Quantitative analysis of detected bands was performed by Image Gauge V4.0 software. Bifactorial ANOVA and post-hoc Bonferroni tests were used for statistical comparisons

## RESULTS

### **Heteromerization between dopamine D<sub>1</sub> and sigma-1 receptors**

The sigma-1 receptor ligands showed no effect by themselves, but exerted modulatory actions on signal transductions related to ion channels or neurotransmitters (Hayashi and Su 2005). However, the basic molecular mechanisms underlying these actions mediated by sigma-1 receptors are still unclear at present. Here by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) approach it was demonstrated the ability of sigma-1 receptors to heteromerize with D<sub>1</sub> dopamine receptors. BRET measurements were performed in transiently co-transfected HEK-293 cells using a constant amount of D<sub>1</sub>-*Rluc* receptor and increasing amounts of sigma-1-YFP receptor. A positive and saturable BRET signal was obtained upon increasing expression of the acceptor (Fig 1A). From the saturation curve, a BRET<sub>max</sub> of 44±4 and a BRET<sub>50</sub> of 18±3 were calculated. The pair adenosine A<sub>1</sub> receptor coupled to *Rluc* and sigma-1-YFP receptor was used as a negative control. As shown in Fig. 1A, the negative control gave a linear non-specific BRET signal, thus confirming the specificity of the interaction between D<sub>1</sub>-*Rluc* and sigma-1-YFP receptors in HEK-293T cells.

It is well known that the dopamine D<sub>1</sub> receptors form homodimers (Ng, et al., 1994; George, et al., 1998), being the homo-oligomerization important for membrane expression (Kong et al., 2006). Therefore the possible formation of oligomeric complexes constituted by a minimum of dopamine D<sub>1</sub> receptor dimer and sigma-1 receptor was investigated by BRET/BiFC technology that combines BRET and molecular complementation. For molecular complementation, the receptor is fused at its C-terminal with the N-terminal (nYFP) or the C-terminal (cYFP) fragments of YFP and the technique is based on the ability to produce a fluorescent complex from non-fluorescent fragments of YFP if a receptor-receptor interaction occurs. To this end, sigma-1-*Rluc* receptor and D<sub>1</sub> receptor fused to YFP fragments were transfected into HEK cells and BRET was determined between sigma-1-*Rluc* receptor as donor and dopamine D1-nYFP-D1-cYFP reconstituted fluorescent receptor homomers as acceptor. Trimer formation was proved by a positive and saturable BRET signal (Fig. 1B). Cells transfected with receptors containing either the cYFP or nYFP fragments in their C-terminal tail did not provide neither positive fluorescent signal nor positive BRET (data not shown). Also a negative control was performed using the GABA receptor fused to *Rluc*, which does not interact with D<sub>1</sub> receptor dimers (Fig. 1B). From a BRET/BiFC saturation curve a BRET<sub>max</sub> of 46±6 and a BRET<sub>50</sub> of 21±5

were calculated.

### **Cocaine binding to sigma-1 receptors results in an alteration of sigma-1 subcellular distribution and changes the quaternary structure of D<sub>1</sub> receptor homomers heteromerizing with sigma-1 receptors**

It is well known that cocaine acts as sigma-1 receptor ligand (Maurice et al., 2001a; Matsumoto et al., 2003; Hayashi and Su, 2005). To ascertain the cocaine effect on the interaction between dopamine D<sub>1</sub> receptors and sigma-1 receptors, first of all it was tested whether the cocaine binding to sigma-1 receptors results in an alteration of sigma-1 subcellular distribution by confocal microscopy. Sigma-1 receptors were constitutively expressed in our HEK-293T cell clone, which did not express DAT (Fig. 2A and B) or D<sub>1</sub> receptors. In naïve HEK cells, sigma-1 receptor staining was punctated corresponding to an endoplasmic reticulum-associated protein (Fig. 2C left panel top images). When dopamine D<sub>1</sub> receptors were transfected in these cells, an increase in the sigma-1 receptors localization at the plasma membrane was observed (Fig. 2C left panel bottom images). These results agree with the D<sub>1</sub> and sigma-1 receptor heteromerization. Interestingly, when 150 µM cocaine was added for 30 min, an increase of sigma-1 receptors expression at the plasma membrane level of naïve cells was observed (Fig. 2C right panels, top images) and an increase in colocalization between sigma-1 and dopamine D<sub>1</sub> receptors was also observed in D<sub>1</sub> receptor expressing cells (Fig. 2C right panels, bottom images), suggesting that cocaine induced an increase of receptor heterotrimers at the plasma membrane level.

Cocaine not only induced changes in the subcellular distribution of sigma-1, but also induced structural changes in the heterotrimeric complexes constituted by a minimum of dopamine D<sub>1</sub> receptor dimer and sigma-1 receptor. To ascertain whether the cocaine binding to sigma-1 resulted in an alteration of the interaction between D<sub>1</sub> receptor protomers in the heterotrimer, BRET experiments were performed in HEK-293T cells expressing D<sub>1</sub>-*Rluc* and D<sub>1</sub>-YFP. In these cells, the BRET saturation curve corresponding to D<sub>1</sub>-*Rluc*-D<sub>1</sub>-YFP pair was drastically reduced in the presence of 150 µM cocaine for 180 min (Fig 3A). This effect was specific for the dopamine receptor since it did not occur when adenosine receptors (A<sub>1</sub>-*Rluc* and A<sub>1</sub>-YFP receptors) were expressed (Fig 3B). The cocaine-induced effect was dose-dependent (Fig. 3C) and although it was seen at short times of preincubation (10 min) the maximum effect was reached at higher preincubation times (Fig 3D). Since the BRET signal for the pair D<sub>1</sub>-*Rluc*-D<sub>1</sub>-YFP was negligible at 180 min of cocaine treatment, it was suggested that cocaine was disrupting D<sub>1</sub> receptor homodimerization. However, the significant cocaine-induced decrease in BRET was not due to D<sub>1</sub> receptor dimer disruption since fluorescence of HEK 293 cells expressing D<sub>1</sub>-cYFP and D<sub>1</sub>-nYFP receptors was not significantly altered by cocaine (Fig. 4). In fact, the fluorescence, which results from D<sub>1</sub>-nYFP-D<sub>1</sub>-cYFP homodimers, was similar in untreated cells and in cells treated with 100 µM cocaine for up to 180 min (Fig 4). Therefore, it was suggested that cocaine altered the quaternary structure of dopamine D<sub>1</sub> receptor



dimers in the heteromer formed by at least two D<sub>1</sub> receptors and one sigma receptor and this resulted in a diminished BRET signal due to a decrease in the energy transfer between *Rluc* and YFP, which are located in the C terminal domains of the D<sub>1</sub> receptors. To confirm this hypothesis and to assess if the cocaine-mediated alteration of BRET signal given by the D<sub>1</sub>-*Rluc*-D<sub>1</sub>-YFP pair was dependent on sigma-1 receptor expression, the RNA interference (RNAi) technology was applied. In the presence of a RNAi for sigma-1 receptors, HEK-293T cells significantly diminished sigma-1 receptors expression (Fig. 5A) without affecting dopamine D<sub>1</sub> receptor expression (Fig.5B). In the presence of RNAi for sigma-1 receptors, the effect of 150 μM cocaine for 30 min was completely prevented (Fig 5C) demonstrating that it was dependent on the sigma-1 receptor. This indicated that cocaine binding to sigma-1 receptors leads to marked changes in the quaternary structure of heterotrimeric complexes constituted by a minimum of dopamine D<sub>1</sub> receptor dimer and sigma-1 receptor.

### **Cocaine binding to sigma-1 receptors modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function in living cells**

In order to know if cocaine binding to sigma-1 receptors was able to modulate the D<sub>1</sub> receptor-mediated signal transduction, CHO cells endogenously expressing sigma-1 receptors (Fig. 6A and B) but not DAT or dopamine D<sub>1</sub> receptors (results not shown) were used. As expected from the known coupling of D<sub>1</sub> receptors to heterotrimeric G<sub>s</sub> proteins (Missale et al., 1998; Neve et al., 2004), the D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF81297 dose-dependently increased the cAMP production in CHO cells transfected with dopamine D<sub>1</sub> receptors (Fig. 6C). The treatment of cells with 150 μM cocaine for 10 min did not induce cAMP increases but robustly enhanced the dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist-induced cAMP (Fig. 6C). These results indicated that cocaine potentiates dopamine D<sub>1</sub> receptor signalling through the cAMP pathway. When cAMP determination was performed in cells treated with RNAi for sigma-1 receptors, the cocaine effect was drastically diminished (Fig. 6C), indicating that the cocaine effect is mediated by sigma-1 receptors.

Another important signaling pathway for neural dopamine function is the MAP kinase pathway. In order to determine if cocaine binding to sigma-1 receptors is able to modulate this pathway, ERK1/2 activation was determined in CHO cells endogenously expressing sigma-1 receptors and transfected for dopamine D<sub>1</sub> receptors. The D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF 81297 dose-dependently induced ERK1/2 phosphorylation (Fig. 7B) with a maximum response at 2 min activation (Fig. 7A). The agonist-induced ERK1/2 phosphorylation was practically reverted by 10 μM D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH 23390 and, interestingly, it was also reverted by 1 μM of the sigma-1 receptors specific ligand PD144.418 (Fig. 7A and B). These results suggest that sigma-1 receptors are not only modulating the D<sub>1</sub> receptor-mediated cAMP signaling but also D<sub>1</sub> receptor triggered MAP kinase pathway. To further test this, we investigated the cocaine effect in these cells. Cocaine by itself dose-dependently (Fig 8A) and time-dependently (Fig. 8B) activated ERK1/2 phosphorylation and

the effect is mediated by sigma-1 receptors since it was strongly diminished in cells transfected with the RNAi for sigma-1 receptors (Fig. 8A and B). The effect was seen at short times of cocaine treatment (10 min) but the maximum effect was reached at 30 min (Fig 8B). The sigma-1-mediated cocaine-induced ERK1/2 phosphorylation depends on dopamine D<sub>1</sub> receptors expression since cocaine did not significantly increase ERK1/2 phosphorylation up to 30 min of treatment in CHO cells not transfected with dopamine D<sub>1</sub> receptors (Fig. 9). Moreover, the cocaine-induced ERK1/2 phosphorylation in cells expressing sigma-1 and dopamine D<sub>1</sub> receptors is not only practically reverted by 1 μM of the sigma-1 receptors specific ligand PD144.418, that acts as an antagonist-like, but also by 10 μM dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH 23390 (Fig. 8 C and D). All these results indicate that cocaine binding to sigma-1 receptors or SKF 81297 binding to dopamine D<sub>1</sub> receptor in the heterotrimeric complexes constituted by dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptor induce ERK1/2 phosphorylation that is equally reverted by antagonists of sigma-1 or dopamine D<sub>1</sub> receptors.

We next investigated the existence of a relationship between cocaine and the dopamine D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF 81297 in ERK 1/2 phosphorylation. In cells expressing dopamine D<sub>1</sub> receptors, the 100 nM SKF 81297-induced ERK1/2 phosphorylation was drastically reverted by the presence of increasing concentrations of cocaine, (Fig. 10A). Analogously, the 150 μM cocaine-induced ERK1/2 phosphorylation was diminished in the presence of increasing concentrations of SKF 81297 (Fig. 10B). The results point out that the co-stimulation of sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptor in the heteromers constituted by dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptors inhibits the MAP kinase signaling.

### **Cocaine binding to sigma-1 receptors modulates dopamine D<sub>1</sub> receptors function in mouse brain striatum**

To investigate the relationship between sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptors in a more physiological context, we compared the pattern of ERK 1/2 phosphorylation upon activation of D<sub>1</sub> receptors, in the presence or in the absence of cocaine, in striatal slices from wild-type mice and sigma-1 receptors knockout mice. Using wild-type mouse striatal slices, the D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF 81297 (1 μM) induced ERK1/2 phosphorylation after 10 min activation (Fig. 11). 150 μM cocaine also induced ERK 1/2 phosphorylation in wild-type mouse striatal slices. The agonist-induced ERK1/2 phosphorylation was practically reverted when agonist stimulation was performed in slices pre-treated with cocaine for 30 min. These results are qualitatively similar to those obtained in transfected cells and point out the existence of a negative cross-talk between cocaine and dopamine D<sub>1</sub> receptor agonists in striatal slices. Interestingly, using sigma-1 receptors knockout mouse striatal slices, cocaine was unable to induce ERK 1/2 phosphorylation, indicating that this cocaine effect in the striatum is mediated by sigma-1 receptors (Fig. 11). Moreover, the 1 μM SKF 81297-induced ERK 1/2 phosphorylation was not modified by 30 min pretreatment with

150  $\mu$ M cocaine (Fig. 11). These results also indicate that the cocaine effect on dopamine D<sub>1</sub> receptor signaling in the striatal slices is mediated by sigma-1 receptors.

## DISCUSSION

It is well known that cocaine exerts multiple effects on dopaminergic transmission (see Introduction). Usually these effects have been investigated in the framework of drug addiction, analyzing the behavioral (withdrawal, craving, seeking...), biochemical (changes in signal transduction) or genetical (changes in the activity of some specific genes) effects that can be seen after more or less prolonged intake of cocaine in humans and in animal models. From these results a huge improvement of knowledge has been reached but, despite that, the first molecular events that occur in the presence of cocaine are poor understood with the exception of the cocaine interaction with DAT. In this context, it was unknown if cocaine was able to modulate dopaminergic transmission by interacting with one of its binding protein, sigma-1 receptor. Here we describe, for the first time, that sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptors can heteromerize in living cells and that cocaine binding to sigma-1 receptors modulates the dopamine D<sub>1</sub> receptors function not only in living cells but also in brain striatal slices.

Although originally proposed as a subtype of opioid receptors, the sigma receptor is now confirmed to be a non-opioid receptor that binds diverse classes of psychotropic drugs including cocaine (Mesangeau et al., 2008) but its role in the cell signaling is not well known. At the cellular level, the acute actions mediated by sigma-1 receptors include the modulation of the ion channels (i.e., K<sup>+</sup> channel, NMDA receptors, IP3 receptors) (Hayashi and Su, 2005). Since this reticulum-associated protein (Alonso et al., 2000) lacks significant homology with known mammalian proteins, the question of how signals are transmitted to their channel targets was intriguing. Aydar et al. (2002) described that sigma-1 modulated the voltage-gated K<sup>+</sup> channel by a protein-protein interaction with Kv1.4 channel. We here describe a mechanism by which sigma-1 receptors modulate dopamine D<sub>1</sub> receptors. By means of BRET experiments it was demonstrated that sigma-1 receptors form heteromers with dopamine D<sub>1</sub> receptors and that a protein-protein interaction is possible between both receptors in living cells. In fact, in agreement with the homodimeric nature of dopamine D<sub>1</sub> receptors (Ng, et al., 1994; George, et al., 1998; Kong, et al., 2006), the existence of oligomeric complexes constituted by a minimum of dopamine D<sub>1</sub> receptor dimer and sigma-1 receptor was demonstrated by BRET/BiFC technique. According with a molecular interaction between sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers, the co-expression of both proteins results in an alteration of sigma-1 subcellular distribution from a punctated staining corresponding to an endoplasmic reticulum-associated protein to the plasma membrane where the D<sub>1</sub> receptors are expressed. It has been described that cocaine, via sigma-1 receptors, can cause the dissociation of a cytoskeletal adaptor protein ankyrin from inositol

(1,4,5)-trisphosphate receptors on the ER as a sigma-1-receptor–ankyrin complex, which then translocates to the plasma membrane (Su and Hayashi, 2001; Hayashi and Su, 2001, 2003a, 2003b). Accordingly with cocaine-induced sigma-1 subcellular redistribution, in the presence of cocaine we observed an increase of sigma-1 receptor expression at the plasma membrane level together with an increase in colocalization between sigma-1 and dopamine D<sub>1</sub> receptors, suggesting that cocaine might induce an increase of the amount of heterotrimeric complexes constituted by dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptor at the plasma membrane level.

We have demonstrated that cocaine binding to sigma-1 receptors in the heterotrimeric complexes constituted by dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptor results in a structural modification of dopamine receptor homomers. In fact cocaine altered the quaternary structure of dopamine D<sub>1</sub> receptor dimers in the heterotrimers and this resulted in a diminished BRET signal due to a decrease in the energy transfer between *Rluc* and YFP, which are located in the C terminal domains of the D<sub>1</sub> receptors. These structural changes occur in parallel with changes in dopamine D<sub>1</sub> receptor function. Cocaine binding to sigma-1 receptors robustly enhanced the dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist-induced cAMP. This sigma-1 receptor-mediated cocaine-induced effect on D<sub>1</sub> receptors can be, almost in part, the molecular basis by which cocaine enhances adenylyl cyclase and protein kinase A signals. In fact, it has been described that in behavior-sensitized animals, dopamine D<sub>1</sub> receptor supersensitivity occurs in the NAc. This cellular event affects the down-stream G<sub>s</sub> protein coupling inducing up-regulation of adenylyl cyclase and protein kinase A signals. Consequently, the phosphorylation of the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) and the expression of immediate-early genes, such as Fos, Jun and ΔFosB occurs (see Anderson and Pierce, 2005; Chen et al., 2009 for revision).

We have observed that cocaine is also able to modulate the dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated ERK 1/2 phosphorylation. In living cells expressing dopamine D<sub>1</sub> receptors but not in non-expressing cells, cocaine binding to sigma-1 receptors or agonist binding to dopamine D<sub>1</sub> receptors increased ERK 1/2 phosphorylation. Interestingly, not only the sigma-1 receptor antagonist but also the dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist counteracted the effect of cocaine and vice-versa. The effects of dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist were counteracted by both dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist and sigma-1 receptor antagonist. Thus, an antagonist of one of the receptor units in the heterotrimeric complexes can induce conformational changes in the other receptor unit and block specific signals originated in the heteromer. In living cells, the cocaine-induced ERK 1/2 phosphorylation was seen at short times of cocaine treatment (10 min) but the maximum effect was reached at 30 min suggesting that in this activation not only is involved the cocaine binding to sigma-1 receptors but also it might be involved cocaine-induced increase of the amounts of heterotrimeric complexes constituted by dopamine D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptor at the plasma membrane due to the cocaine-promoted sigma-1 subcellular redistribution to the

plasma membrane. We have observed a negative relationship between cocaine and dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist in ERK 1/2 phosphorylation in both living cells and mouse striatal slices. The dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist-induced ERK 1/2 phosphorylation was practically reverted when agonist stimulation was performed in slices pre-treated with cocaine. The cocaine-induced ERK 1/2 phosphorylation and the cocaine-induced negative modulation of D<sub>1</sub> dopamine receptors was mediated by sigma-1 receptors since it was not observed in sigma-1 receptor knockout mouse striatal slices. The sigma-1-mediated cocaine inhibition of dopamine D<sub>1</sub> receptor-induced ERK 1/2 activation is not related with the cocaine-induced ERK 1/2 phosphorylation in a subset of neurons in reward-related brain regions in mice exposed to cocaine intake (Lu et al., 2006; Girault et al 2007). This long-term action of cocaine activation depends upon dopamine D<sub>1</sub> receptors but also upon other receptors including glutamate receptors (Schumann and Yaka, 2009; Boudreau et al., 2009; Narasimhaiah et al., 2009) and involves the D<sub>1</sub> receptor-mediated cAMP/protein kinase A/DARPP32 pathway (Valjent et al., 2005, 2009). This might represent an integration point between glutamatergic inputs from cortical and limbic regions and dopaminergic inputs (mainly D<sub>1</sub>-like receptor-dependent) from mesolimbic nuclei in the striatonigral pathway (Fasano et al, 2009). Its concomitant activation by these two distinct inputs might create a “permissive” state for behaviorally salient plasticity (Fasano et al., 2009).

Our results demonstrate, that sigma-1 receptors and dopamine D<sub>1</sub> receptors can form heteromers in living cells, supporting a sigma-1 receptors-mediated cocaine-induced effect on dopamine D<sub>1</sub> receptors structure and function. By means of its interaction with sigma-1 receptors, a short-time cocaine effect focused dopamine D<sub>1</sub> receptors signaling to cAMP pathway. This would induce an increase in activity of neurons projecting from nucleus accumbens to ventral tegmental area that are strictly limited to neurons expressing D<sub>1</sub> receptors (Anderson and Pierce, 2005) and might switch-on other signaling pathways involved in long-time cocaine effects. In summary, our results describe a new mechanism by which cocaine might modulate dopaminergic transmission.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hanna Hoffmann (Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology Fac. Medicin, Universitat Autònoma de Barcelona) for help in the obtention of brain striatal slices. We acknowledge the technical help obtained from Jasmina Jiménez (Molecular Neurobiology laboratory, Barcelona University). This study was supported by Grants from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2008-00146 to E.I.C. SAF2009-07276 to R.F), grant 060110 from Fundació La Marató de TV3 to EIC.

## REFERENCES

- Alonso G., Phan VL, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M and Maurice T (2000) Immunocytochemical localization of the sigma1 receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97: 155–170
- Anderson SM and Pierce RC (2005) Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: Implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacology & Therapeutics* 106: 389–403
- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA and Jackson MB (2002) The Sigma Receptor as a Ligand-Regulated Auxiliary Potassium Channel Subunit. *Neuron* 34: 399–410
- Bertolino A, Fazio L, Di Giorgio A, Blasi G, Romano R, Taurisano P, Caforio G, Sinibaldi L, Ursini G, Popolizio T, Tirota E, Papp A, Dallapiccola B, Borrelli E, and Sadee W (2009) Genetically Determined Interaction between the Dopamine Transporter and the D2 Receptor on Prefronto-Striatal Activity and Volume in Humans. *J Neurosci*, 29:1224–1234
- Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Herve D, Valjent E, Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28: 5671-568
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, Newman AH, Javitch JA, Weinstein H, Gether U and Loland CJ (2008) The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Natur Neurosci* 11: 780-789
- Boudreau AC, Ferrario CR, Glucksman MJ and Wolf ME (2009) Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine. *J Neurochem* 110: 363-377
- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou FM, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T, Han DD, Gu HH. (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9333–9338
- Chen JC, Chen PC and Chiang YC (2009) Molecular Mechanisms of Psychostimulant Addiction. *Chang Gung Med J* 32:148-154
- Di Chiara G and Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7: 69-76

De Mei C, Ramos M, Iitaka C and Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 9: 53–58

Fasano S, D'Antoni A, Orban PC, Valjent E, Putignano E, Vara H, Pizzorusso T, Giustetto M, Yoon B, Soloway P, Maldonado R, Caboche R, and Brambilla R (2009) Ras-Guanine Nucleotide-Releasing Factor 1 (Ras-GRF1) Controls Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling in the Striatum and Long-Term Behavioral Responses to Cocaine. *Biol Psychiatry* 66: 758–768

Ferrada C, Moreno E, Casadó V, Bongers G, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferré S, Lluís C, Franco R. (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 157: 64-75

Gerfen CR (2004). Basal Ganglia. in *The Rat Nervous System*, ed Paxinos G Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp 445-508

George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY and O'Dowd BF (1998) A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* 273: 30244-30248

Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8606-8611

Girault JA, Valjent E, Caboche J and Hervé D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Current Opinion in Pharmacology* 7: 77–85

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM and Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606–612

Hayashi T and Su TP (2001) Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 491–496

Hayashi T and Su TP (2003a) Sigma-1 receptors form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum (ER): roles in ER lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 306: 718-725

Hayashi T and Su TP (2003b) Intracellular dynamics of sigma-1 receptors in NG108-15 cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 306: 726-733

Hayashi T and Su TP (2005) The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. *Current Neuropharmacology*, 3: 267-280

Huang X, Gu HH, and Chang-Guo Zhan CG (2009) Mechanism for Cocaine Blocking the Transport of Dopamine: Insights from Molecular Modeling and Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.* In the press

Kong MM, Fan T, Varghese G, O'Dowd BF and George SR (2006) Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. *Mol Pharmacol* 70: 78-89

Konradi C (1998) The molecular basis of dopamine and glutamate interactions in the striatum. *Adv Pharmacol* 42:729-733

Koob GF (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101(Suppl. 1):23-30

Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT and Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *TRENDS in Neurosciences* 29: 695-703

Matsumoto R R, McCracken K A, Friedman M J, Pouw B, De Costa B R and Bowen W D (2001) Conformationally restricted analogs of BD1008 and an antisense oligodeoxynucleotides targeting sigma-1 receptors produce anti-cocaine effects in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 419: 163–174

Matsumoto R R, McCracken KA, Pouw B, Zhang Y and Bowen WD (2002) Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* 42; 1043–1055

Matsumoto R R, Liu Y, Lerner M, Howard E W and Brackett D J (2003) Sigma receptors: Potential medications development target for anticocaine agents. *Eur. J. Pharmacol.* 469: 1–12

Maurice, T., Phan, V.L., Privat, A. (2001a) The anti-amnesic effects of sigma1 receptor agonists confirmed by *in vivo* antisense strategy in the mouse. *Brain Res.*, 898, 113-121

Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P. (2001b) The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 37:116–132.

Mésangeau C, Narayanan S, Green AM, Shaikh J, Kausal N, Virad E, Xu YT, Fishback JA, Poupaert JH, Matsumoto RR and McCurdy CR (2008) Conversion of a Highly Selective Sigma-1 Receptor–Ligand to Sigma-2 Receptor Preferring Ligands with Anticocaine Activity. *J. Med. Chem.* 51: 1482–1486



Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189-225.

Narasimhaiah R, Kamens HM and Picciotto MR (2009) Effects of galanin on cocaine-mediated conditioned place preference and ERK signaling in mice. *Psychopharmacology* 204: 95–102

Neve KA, Seamans JK and Trantham-Davidson H (2004) Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 24: 165-205

Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M and O'Dowd BF (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* 267: 7-19

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR and Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self- administration of cocaine. *Science* 237: 1219–1223

Schumann J and Yaka R (2009) Prolonged Withdrawal from Repeated Noncontingent Cocaine Exposure Increases NMDA Receptor Expression and ERK Activity in the Nucleus Accumbens. *J Neuroscience* 29: 6955– 6963

Su TP and Hayashi T (2001) Cocaine affects the dynamics of cytoskeletal proteins *via* sigma-1 receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22: 456–458

Su TP, Hayashi T and Vaupel DB (2009) When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor *Science Signaling* 2: 1-4

Tan S, Hermann B, Borrelli E (2003) Dopaminergic mouse mutants: investigating the roles of the different dopamine receptor subtypes and the dopamine transporter. *Int Rev Neurobiol* 54:145-197

Torres GE and Amara SG (2007) Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 17: 304–312

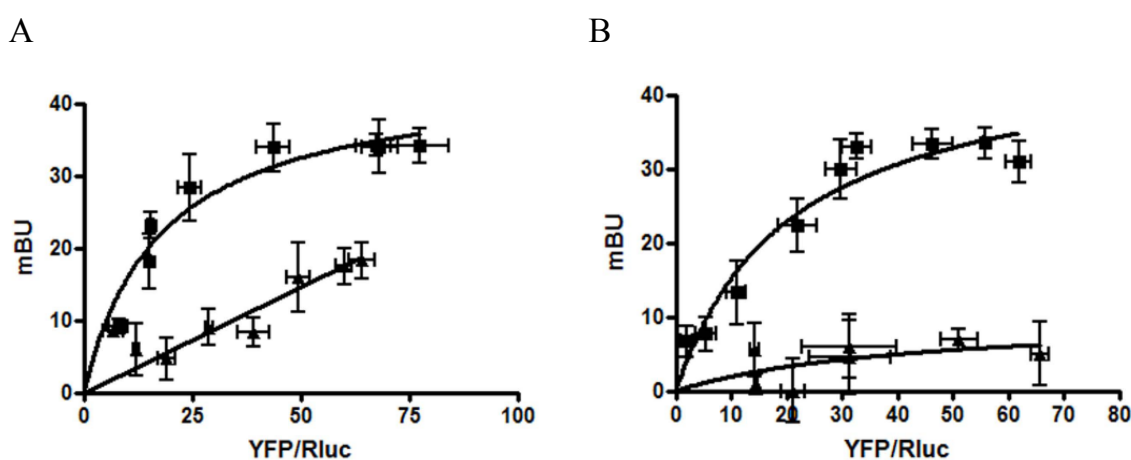
Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA. (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:491-496

Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Aubier B, Greengard P, Hervé D and Girault JA (2009) Mechanisms of Locomotor Sensitization to Drugs of Abuse in a Two-Injection Protocol. *Neuropsychopharmacology* in the press

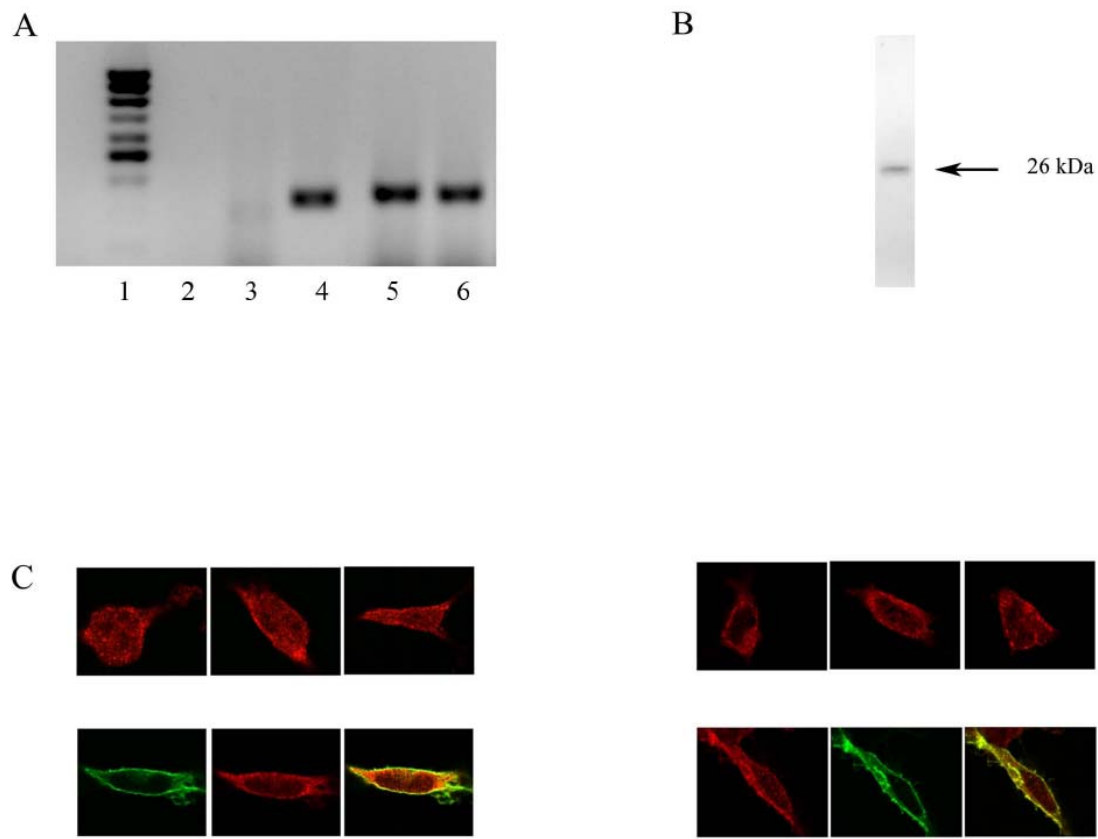
Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79:945-955.

Zhang D, Zhang L, Tang Y, Zhang Q, Lou D, Sharp FR, Zhang J and Xu M (2005) Repeated Cocaine Administration Induces Gene Expression Changes through the Dopamine D1 Receptors *Neuropsychopharmacology* 30: 1443–1454

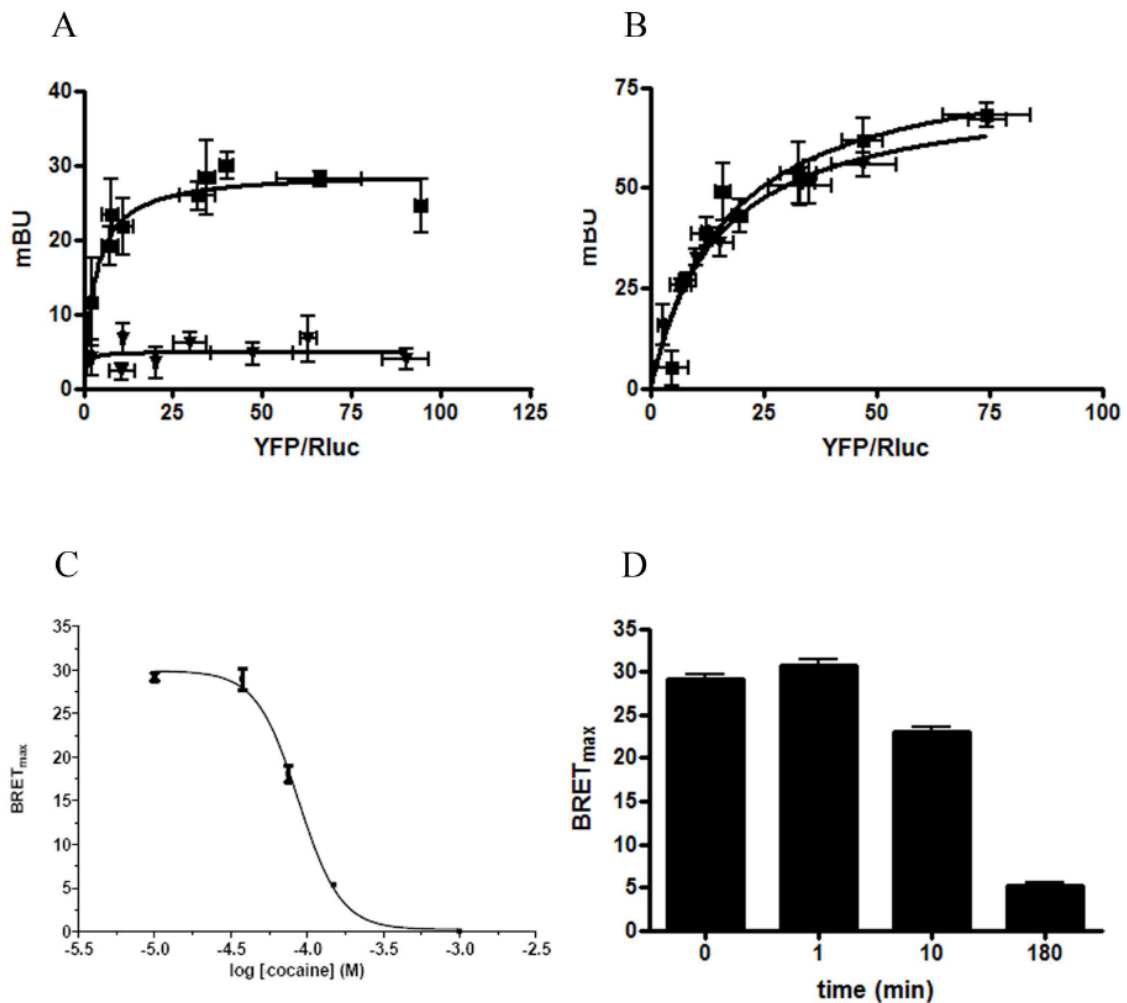
## FIGURE LEGENDS



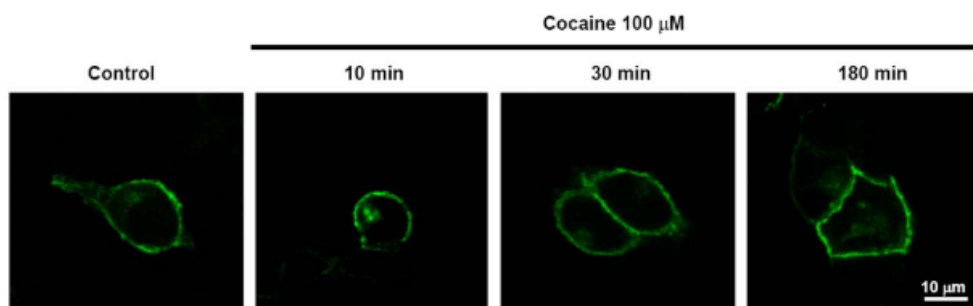
**Figure 1. Heteromerization between dopamine D<sub>1</sub> and sigma-1 receptors in living cells.** In (A) BRET saturation experiments (squares) were performed using HEK-293 cells transfected with 0.6  $\mu\text{g}$  of cDNA corresponding to D<sub>1</sub>-Rluc receptor and increasing amounts of cDNAs corresponding to sigma-1-YFP receptor (0.2 to 2  $\mu\text{g}$  cDNA). As negative controls (triangles) cells were transfected with 0.4  $\mu\text{g}$  of adenosine A<sub>1</sub>-Rluc receptor and increasing amounts of cDNAs corresponding to sigma-1-YFP receptor (0.2 to 2  $\mu\text{g}$  cDNA). In (B) Heteromeric complexes between D<sub>1</sub> receptor homomers and sigma-1 receptors were detected by a combination of bimolecular fluorescence complementation and BRET. BRET saturation curve (squares) was obtained using HEK-293T cells cotransfected with 0.4  $\mu\text{g}$  of cDNA corresponding to sigma-1-Rluc receptor and increasing equal amounts of cDNAs corresponding to D<sub>1</sub>-nYFP and D<sub>1</sub>-cYFP receptors (0.5 to 4  $\mu\text{g}$  cDNA). As negative controls (triangles) cells were transfected with 0.5  $\mu\text{g}$  of GABAB<sub>2</sub>-Rluc receptor and increasing equal amounts of cDNAs corresponding to D<sub>1</sub>-nYFP and D<sub>1</sub>-cYFP receptors (0.5 to 4  $\mu\text{g}$  cDNA). In (A) and (B) both fluorescence and luminescence for each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (approximately 100,000 bioluminescence units) while monitoring the increase in acceptor expression (1000 to 10,000 fluorescence units). The relative amount of acceptor is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc). BRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of five to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor.



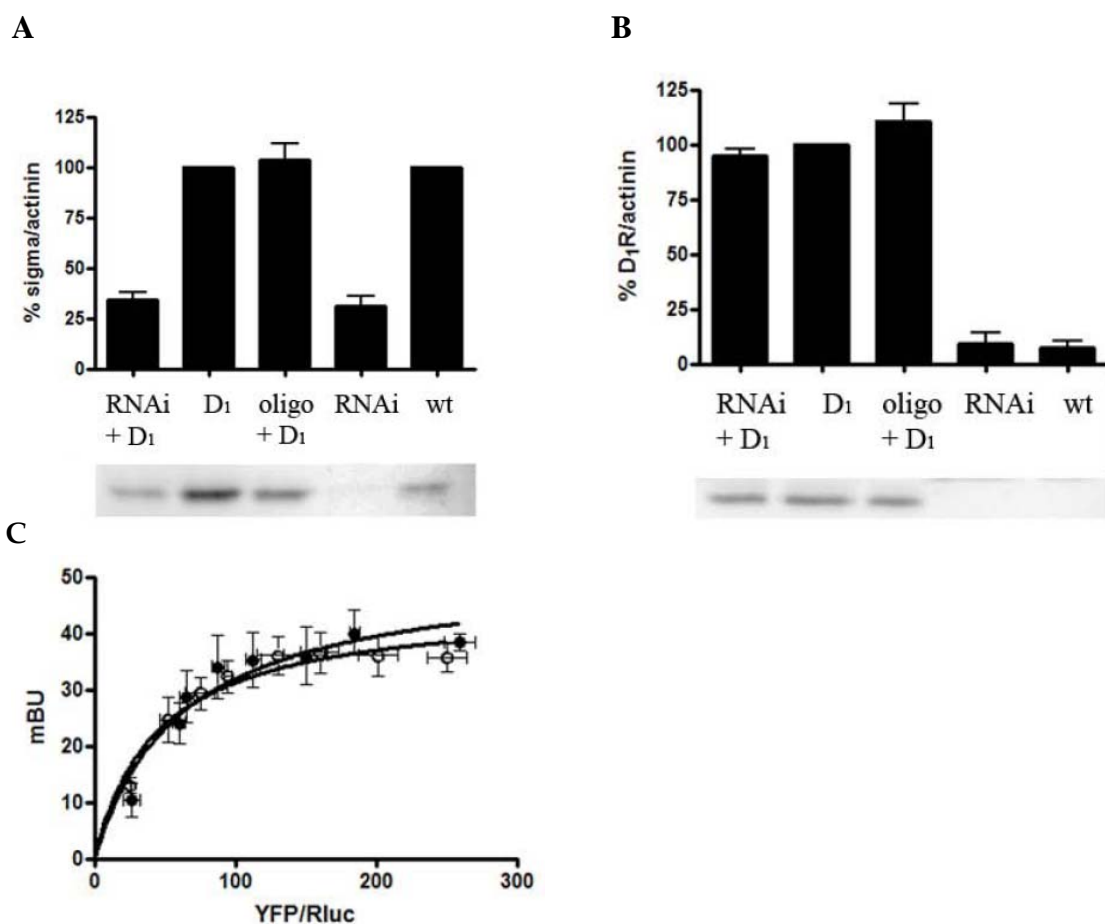
**Figure 2. Expression and subcellular distribution of sigma-1 receptors.** In (A), sigma-1 and DAT expression in HEK-293T cells was analyzed by RT-PCR. RT-PCR was performed using total RNA from cells (lanes 2, 3, 5 and 6) or RNA from human striatum as DAT positive control (lane 4) and primers specific for the human sigma-1 receptor gene (lane 5), for the human DAT gene (lanes 3 and 4) or for human GADP (lane 6). RNA from cells without primers (lane 2) was included as negative control. Molecular mass markers are shown in lane 1. In (B), HEK cell membranes were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with the anti-sigma-1 receptor antibody. The arrow indicates the position of the band corresponding to the sigma-1 receptor (about 26 kDa). In (C) confocal microscopy images were shown. HEK-293T cells transfected (bottom panels) or not (top panels) with 1 μg cDNA corresponding to dopamine D<sub>1</sub>-YFP receptor, were treated (right images) or not (left images) with 150 μM cocaine for 30 min. Sigma-1 (red) and dopamine D<sub>1</sub> (green) receptors were identified by immunocytochemistry as indicated in Methods. Colocalization is shown in yellow.



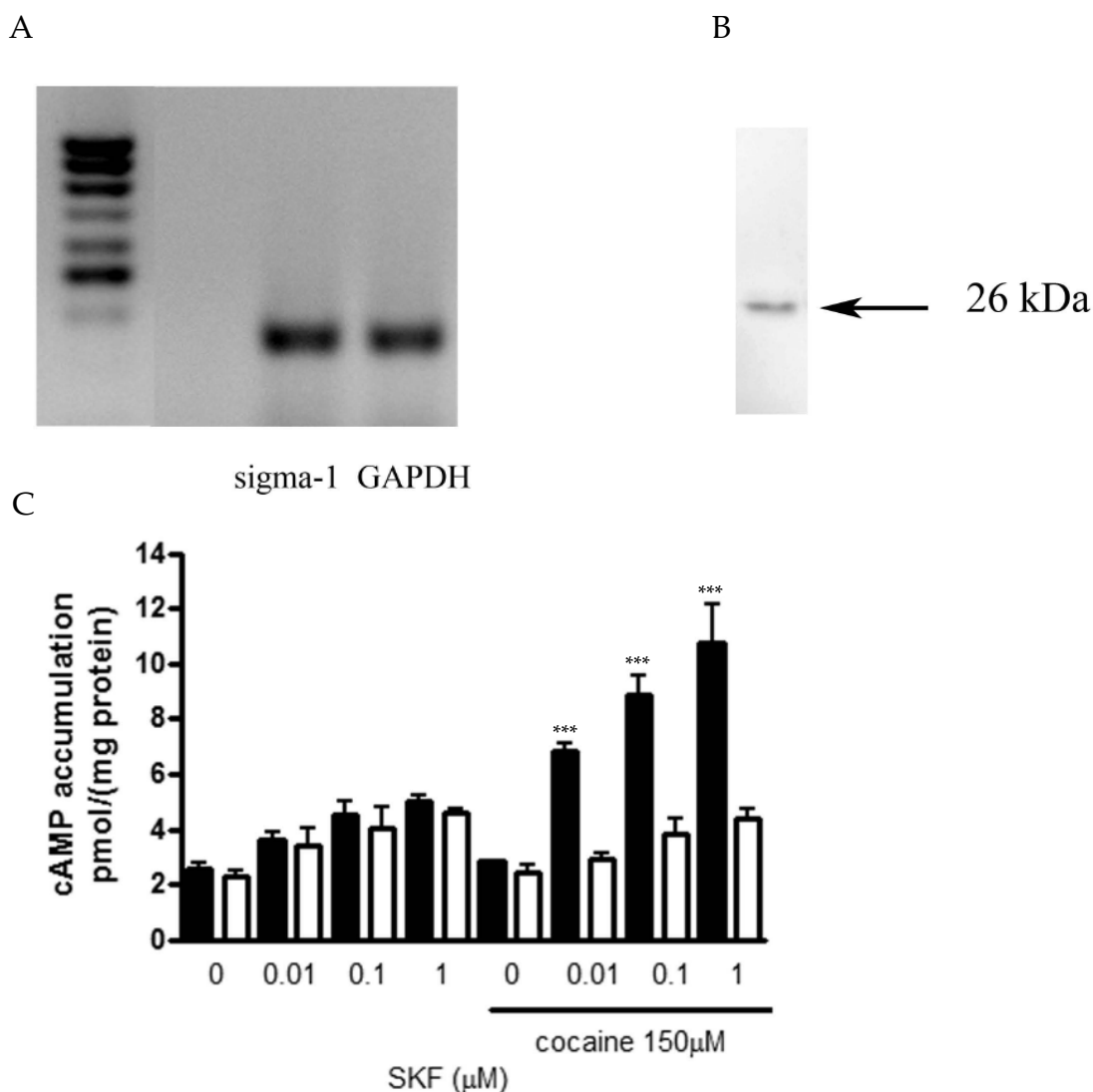
**Figure 3. Cocaine effect on dopamine D<sub>1</sub> receptor homomerization.** BRET was measured in HEK-293T cells co-expressing D<sub>1</sub>-*Rluc* and D<sub>1</sub>-YFP (A) or adenosine A<sub>1</sub>-*Rluc* and adenosine A<sub>1</sub>-YFP (B) receptors, treated with (□) or without (■) 150  $\mu$ M cocaine for 180 min. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid DNA for the YFP construct (1000 to 10,000 fluorescence units) whereas the DNA for the *Rluc* construct was maintained constant (approximately 100,000 bioluminescence units). Both fluorescence and luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm equal expression of *Rluc* while monitoring the increase of YFP expression. The relative amounts of BRET acceptor are expressed as the ratio between the fluorescence of the acceptor and the luciferase activity of the donor. BRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of four to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor. In (C) cells were treated for 180 min with the indicated concentrations of cocaine prior to the determination of BRET. BRET<sub>max</sub> data are expressed as means  $\pm$  S.D. of four to six different experiments. In (D), cells were treated with 150  $\mu$ M cocaine for the indicated times prior to the determination of BRET. BRET<sub>max</sub> data are expressed as means  $\pm$  S.D. of four to six different experiments.



**Figure 4 Cocaine did not disrupt D<sub>1</sub>-nYFP-D<sub>1</sub>-cYFP receptor homomerization.** HEK 293T cells were co-transfected with equal amounts of cDNAs corresponding to D<sub>1</sub>-nYFP and D<sub>1</sub>-cYFP receptors (3 μg cDNA) and were treated or not (control) with 100 μM cocaine for up to 180 min. The D<sub>1</sub>-nYFP-D<sub>1</sub>-cYFP fluorescence signal was visualized directly under the confocal microscope. Scale bar: 10 μm

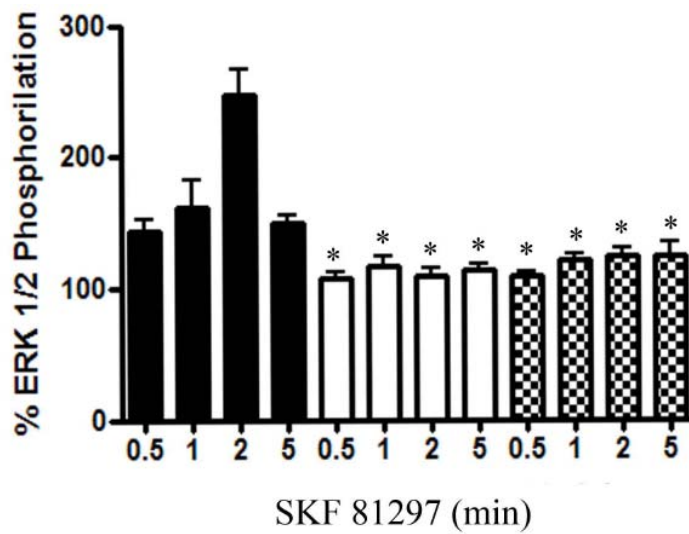


**Figure 5. Cocaine effect on dopamine D<sub>1</sub> receptor homomerization was mediated by sigma-1 receptors.** In (A) and (B), HEK-293T cells were transfected or not (wt) with oligonucleotides corresponding to RNAi for human sigma-1 receptors (RNAi) as indicated in Materials and Methods. HEK-293T cells were transfected with 0.5  $\mu$ g cDNA corresponding to dopamine D<sub>1</sub> receptor (D1) or cotransfected with cDNA for D<sub>1</sub> receptors and oligonucleotides corresponding to RNAi for human sigma-1 receptors (RNAi+D1). As a negative control an irrelevant oligonucleotide was transfected instead of RNAi for sigma-1 receptors (oligo+D1). Membranes from these cells were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with the anti-sigma-1 antibody (A) or dopamine D<sub>1</sub> (B) receptor antibody. In all cases, PVDF blots were stripped and probed with an actinin antibody to normalize values and to rule out differences in the protein application. Values are mean  $\pm$  s.e.m. of three experiments and a representative western-blot for sigma-1 (A) or D<sub>1</sub> (B) receptors is shown. In (C) BRET saturation experiments were performed in HEK-293T cells co-transfected with 50 pmol of oligonucleotides corresponding to RNAi for human sigma-1 receptors, 0.5  $\mu$ g of cDNA corresponding to D<sub>1</sub>-*Rluc* receptor and increasing amounts of cDNAs corresponding to D<sub>1</sub>-YFP (0.3 to 3  $\mu$ g of cDNA), treated (white symbols) or not (black symbols) with 150  $\mu$ M cocaine for 30 min. Both fluorescence and luminescence for each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expression (approximately 100,000 bioluminescence units) while monitoring the increase in acceptor expression (1000 to 10,000 fluorescence units). The relative amount of acceptor is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (*Rluc*). BRET data are expressed as means  $\pm$  S.D. of four to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor.

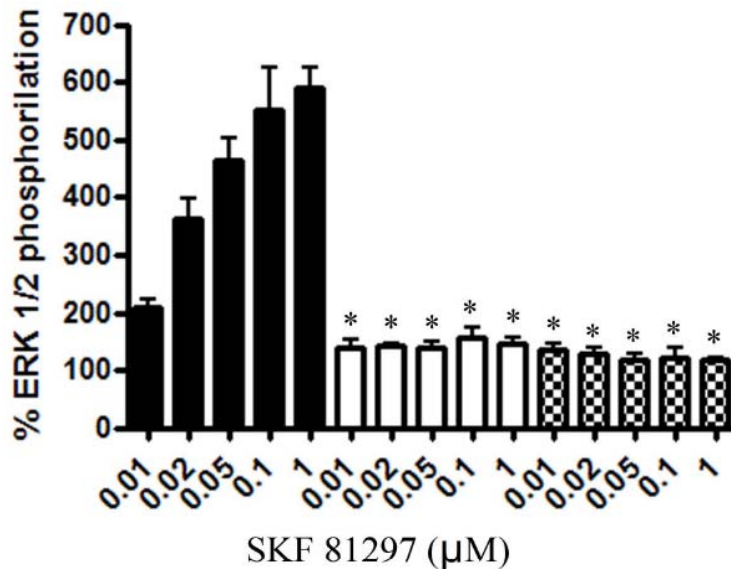


**Figure 6. Cocaine effect on D<sub>1</sub> receptor-mediated cAMP production.** In (A), sigma-1 receptor expression in CHO cells was analyzed by RT-PCR. RT-PCR was performed using total RNA from cells (lanes 1, 2, 3) and primers for the chine hamster sigma-1 receptor (lane 2), or for GAPD (lane 3). RNA from cells without primers (lane 1) was included as negative control. In (B), CHO cell membranes were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with the anti-sigma-1 receptors antibody. The arrow indicates the position of the band corresponding to the sigma-1 receptor (about 26 kDa). In (C), CHO cells transfected with 4.5 μg of cDNA for dopamine D<sub>1</sub> receptor (black columns) or cotransfected with 4.5 μg of cDNA for dopamine D<sub>1</sub> receptor and 6.25 μg of oligonucleotides corresponding to RNAi for sigma-1 receptors (white columns) were stimulated with increasing concentrations of dopamine D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 for 10 min in the absence or presence of 150 μM cocaine or with cocaine alone. Results are a mean ± s.e.m of three to six independent experiments performed in triplicate. Data was analyzed using student's t test and yielded in \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001 vs. their respective control in absence of cocaine.

A

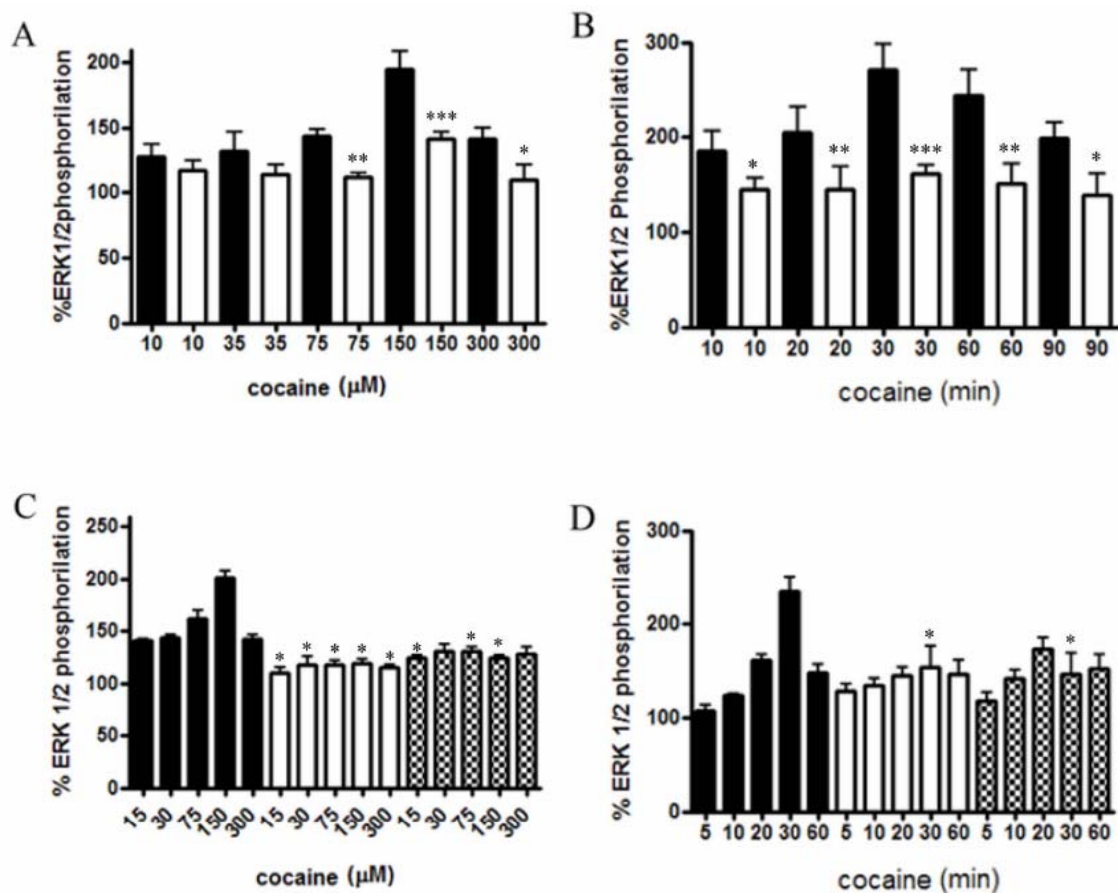


B

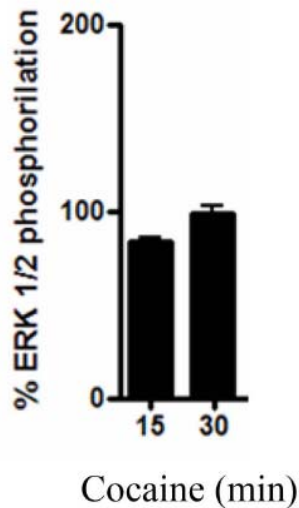


**Figure 7. Effect of sigma-1 receptor ligands on dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated ERK 1/2 phosphorylation.** CHO cells transfected with 1.5 µg of cDNA for dopamine D<sub>1</sub> receptor were stimulated with 100 nM of the D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 for increasing times (A) or with increasing concentrations of SKF 81297 for 2 min (B) in the absence (black columns) or in the presence of 10 µM of the D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH 23390 (white columns) or 1 µM of the sigma-1 receptors specific ligand PD144.418 (grey columns). ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are a mean ± s.e.m of four independent experiments performed in duplicate. Data was analyzed using student's t test and yielded in \*P<0.001 vs. their respective control in absence of SCH 23390 or PD144.418.

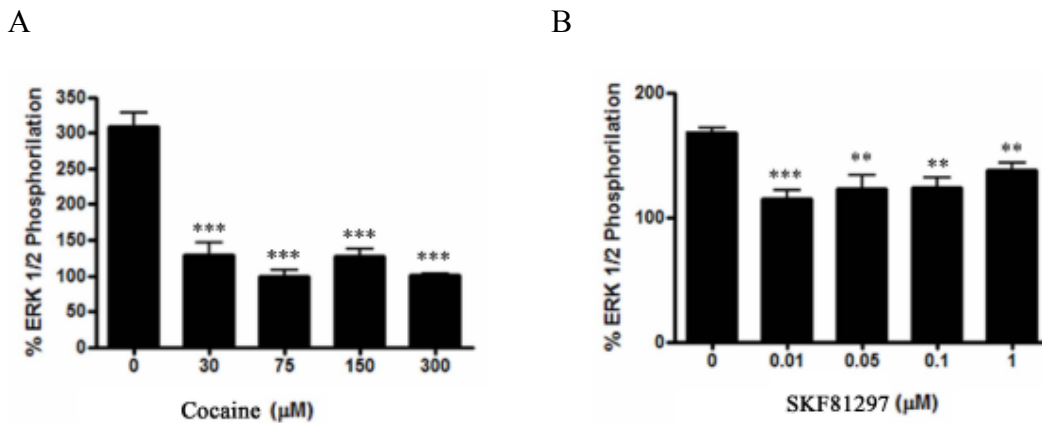




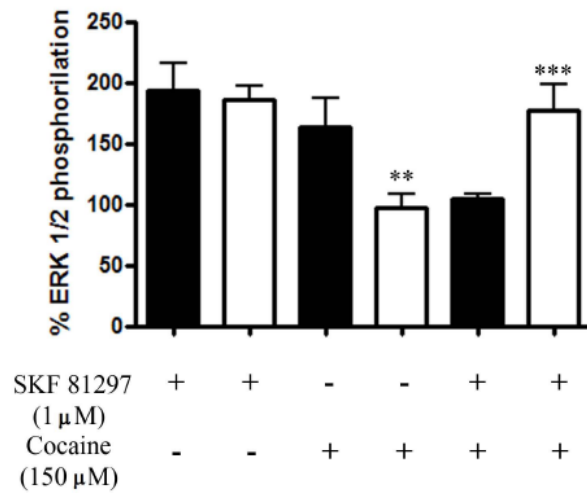
**Figure 8. Cocaine-induced sigma-1-mediated ERK 1/2 phosphorylation.** In (A) and (B) CHO cells not transfected (black columns) or transfected (white columns) with oligonucleotides corresponding to RNAi for sigma-1 receptors were incubated with increasing cocaine concentrations for 30 min (A) or with 150 μM cocaine for increasing times (B). In (C) and (D) CHO cells were treated (30 min) with increasing cocaine concentrations (C) or with 150 μM cocaine for different times in absence (black columns) or in presence of 10 μM of the D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH 23390 (white columns) or 1 μM sigma-1 receptor specific ligand PD144.418 (grey columns). ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are a mean ± s.e.m of four independent experiments performed in duplicate. In (A) and (B), data was analyzed using student's t test and yielded in \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001 vs. their respective control in cells not transfected with oligonucleotides corresponding to RNAi for sigma-1 receptors. In (C) and (D) data was analyzed using student's t test and yielded in \*P<0.001 vs. their respective control in absence of SCH 23390 or PD144.418.



**Figure 9. Cocaine effect on ERK 1/2 phosphorylation in non-transfected CHO cells.** CHO cells were incubated with 150  $\mu$ M cocaine for 15 or 30 min. ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are a mean  $\pm$  s.e.m of four independent experiments performed in duplicate.



**Figure 10. Relationship between cocaine and dopamine D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF 81297 in ERK 1/2 phosphorylation.** CHO cells transfected with 1.5  $\mu$ g of cDNA for dopamine D<sub>1</sub> receptor were treated or not for 30 min with increasing cocaine concentrations (A) or with 150  $\mu$ M cocaine (B) and during the last 2 min 100 nM (A) or increasing concentrations (B) of the D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 were added. ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are a mean  $\pm$  s.e.m of four independent experiments performed in duplicate. Data was analyzed using student's t test and yielded in \*P<0.05, \*\*P<0.01, and \*\*\*P<0.001 vs. cells not treated with cocaine (A) or with SKF 81297 (B).



**Figure 11. Relationship between cocaine and dopamine D<sub>1</sub> receptor full agonist SKF 81297 in ERK 1/2 phosphorylation in wild-type and sigma-1 knockout mouse brain striatal slices.** Wild-type (black) and sigma-1 receptors knockout (white) mouse striatal slices were treated with 1 μM of the D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 for 10 min, with 150 μM cocaine for 30 min or with 150 μM cocaine for 30 min and during the last 10 min 1 μM of the D<sub>1</sub> receptor agonist SKF 81297 was added. ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Five wild-type and five knockout animals were used and for each condition, the immunoreactive bands from 4 slices obtained from different animals were quantified. Values represent the mean ± s.e.m. of the % of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. Significant differences respect to the wild-type mice were calculated by bifactorial ANOVA followed by post-hoc Bonferroni's tests (\*\* p<0.01 and \*\*\* p<0.001).



## **RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



A pesar de una cierta resistencia inicial por parte de la comunidad científica, la existencia de heterómeros entre diversos receptores de neurotransmisores y neuromoduladores es, hoy por hoy, un hecho aceptado. La heteromerización implica cambios en la forma de entender la neurotransmisión. Así, los receptores no pueden considerarse como una única unidad funcional, sino como agregados multimoleculares localizados en el plano de la membrana plasmática (Franco, et al., 2003). La heteromerización confiere a los receptores propiedades bioquímicas distintas de los componentes individuales, como cambios en la funcionalidad y en las propiedades farmacológicas (Terrillon y Bouvier, 2004). Los ensayos de doble híbrido, *pull-down* o coimmunoprecipitación han hecho posible la construcción de mapas de las redes moleculares formadas por interacciones proteína-proteína entre las proteínas citosólicas; sin embargo, estas técnicas se ven limitadas cuando se analizan proteínas de membrana. Recientemente, el desarrollo de las técnicas biofísicas basadas en la transferencia de energía de resonancia, como BRET y FRET han facilitado la demostración de la homodimerización y heterodimerización de proteínas de membrana y especialmente GPCR, en células vivas (Agnati, et al., 2003; Franco, et al., 2003; Bouvier, et al., 2001; Pflieger, et al., 2006; Milligan, et al., 2004).

Al iniciarse esta Tesis se conocía la existencia de la formación de diferentes heterómeros entre distintos GPCR. Entre ellos, las parejas formadas por los receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y D<sub>2</sub> de dopamina (Canals, et al., 2003; Ciruela, et al., 2004), los receptores D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides (Kearn, et al., 2005) y la pareja de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides descrita más recientemente (Carriba, et al., 2007). Sin embargo, se desconocía si estos heterómeros podían oligomerizar con otros receptores de neurotransmisores o neuromoduladores importantes en el estriado, como tampoco se conocían muchas de las implicaciones funcionales de la heteromerización o de la existencia de moléculas capaces de modularlos. Este desconocimiento estaba motivado fundamentalmente por la falta de técnicas capaces de determinar interacciones moleculares entre más de dos proteínas. En esta Tesis se han diseñado y puesto a punto dos técnicas basadas en la transferencia de energía de resonancia que permiten detectar oligómeros constituidos por tres proteínas. Mediante la aplicación de estas técnicas se han podido detectar heterotrímeros constituidos por receptores A<sub>2A</sub> de adenosina, D<sub>2</sub> de dopamina y CB<sub>1</sub> de cannabinoides. A partir de los resultados, se ha propuesto un modelo de estructura cuaternaria del heterotrímero y se han estudiado algunas consecuencias funcionales derivadas de la heteromerización.

En el trabajo **Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET** se describe la nueva técnica de SRET, que

permite detectar la heteromerización entre tres proteínas distintas. La técnica de SRET (*Sequential Resonance Energy Transfer*) se basa en la aplicación secuencial de BRET y FRET y requiere una adecuada combinación de proteínas de fusión que actúen como dadores y aceptores de BRET y FRET. La utilización de diferentes sustratos para la proteína *Rluc* resulta en distintos perfiles de emisión que dan lugar a dos variantes de la técnica, SRET<sup>1</sup> y SRET<sup>2</sup>. En SRET<sup>2</sup>, la proteína-*Rluc* oxida al sustrato DeepBlue C y emite una señal bioluminiscente que es capaz de excitar la proteína-GFP<sup>2</sup>. La fluorescencia resultante corresponde a una señal de BRET<sup>2</sup>. Así, la proteína-GFP<sup>2</sup> excitada emite una energía que es capaz de excitar a la proteína-YFP, dando una señal de FRET. En SRET<sup>1</sup>, el sustrato coelenterazine H es oxidado por la proteína-*Rluc*, excitando, a su vez, a la proteína-YFP. La proteína-YFP emite energía que es transferida a la proteína-DsRed, que da una señal de FRET. En el SRET<sup>2</sup> la eficiencia de FRET de la pareja GFP<sup>2</sup>/YFP es más elevada que la formada por la pareja más comúnmente utilizada en la técnica de FRET, CFP/YFP. Además, la GFP<sup>2</sup> muestra un pico máximo de excitación a 396 nm, una longitud de onda donde la YFP aceptora es excitada por debajo del nivel de detección, convirtiendo esta pareja de FRET en óptima para aplicaciones que requieran gran sensibilidad. El inconveniente que muestra SRET<sup>2</sup> es que los espectros de emisión de las proteínas GFP<sup>2</sup> y YFP se solapan parcialmente. Por lo tanto, se debe determinar la *spectral signature* de estas proteínas de fusión y debe tenerse en cuenta en la evaluación de los niveles de FRET, introduciendo un pequeño obstáculo en la cuantificación del FRET. El SRET<sup>1</sup> posee las mismas ventajas que el SRET<sup>2</sup> pero evita haber de tener en cuenta las *spectral signatures*, ya que la pareja YFP/Dsred tiene una buena separación de espectros de fluorescencias.

La técnica de SRET ha sido validada con el diseño de una combinación específica de controles positivos y negativos. Utilizando las proteínas de fusión *Rluc*-GFP<sup>2</sup>-YFP (SRET<sup>2</sup>) o *Rluc*-YFP-DsRed (SRET<sup>1</sup>) se obtuvo una señal significativa y específica de SRET, lo que constituye un control positivo de la técnica. Dada la naturaleza heterotrimérica de las proteínas G, éstas constituyen un buen modelo para validar la utilidad de la técnica de SRET. Así, en células que expresaban G<sub>α</sub>-GFP<sup>2</sup>, G<sub>β</sub>-YFP y G<sub>γ</sub>-*Rluc* para el SRET<sup>2</sup> y G<sub>α</sub>-DsRed, G<sub>β</sub>-YFP y G<sub>γ</sub>-*Rluc* para el SRET<sup>1</sup>, se obtuvo una eficiencia de SRET significativa. Además, la activación de la proteína heterotrimérica G con AlF<sub>4</sub> incrementó significativamente el valor de SRET. Este incremento puede ser provocado por un aumento en la fluorescencia o bioluminiscencia debidos al AlF<sub>4</sub> o más probablemente, por la activación de la proteína G, mediada por el AlF<sub>4</sub>, que induce un cambio conformacional que potencia la transferencia de energía. La técnica de SRET es suficientemente sensible para detectar cambios conformacionales asociados a la activación de la proteína G. Estos



resultados están de acuerdo con la alta afinidad observada en la unión de  $G_{\alpha}$ -GTP y  $G_{\beta\gamma}$  (Kearn, et al., 2006) (comparada con  $G_{\alpha}$ -GDP y  $G_{\beta\gamma}$ ) y con las observaciones que  $G_{\alpha}$  y  $G_{\beta\gamma}$  parecen permanecer unidas durante la estimulación del ciclo GTPasa por la activación del receptor (Peleg, et al., 2002; Bünemann, et al., 2003; Galés, et al., 2005; Evanko, et al., 2005; Frank, et al., 2005; Adjobo-Hermans, et al., 2006).

La clasificación de todas las moléculas y sus interacciones en una célula viva es un punto fundamental en la investigación biomédica postgenómica. En los procesos celulares participan múltiples interacciones entre proteínas que incluyen también a otras biomoléculas. Las interacciones físicas entre proteínas constituyen un importante grupo de redes de interacciones biomoleculares como las redes moleculares horizontales neuronales. Las redes moleculares horizontales existen a nivel de membrana plasmática neuronal, donde un grupo específico de GPCR interaccionan y integran los mensajes de una gran variedad de neurotransmisores. Por lo tanto, la identificación y el estudio de las redes moleculares horizontales permiten entender mejor la función neuronal. Las redes de interacciones moleculares pueden ser caracterizadas como nodos (biomoléculas) conectados por uniones (interacciones). En las redes de interacciones físicas proteína-proteína los nodos representan proteínas y las uniones representan el contacto directo entre las proteínas. Debido a las limitaciones de las técnicas para identificar las interacciones proteicas (especialmente en el caso de los GPCR) muchos de los nodos y uniones de los complejos proteicos que forman las redes permanecen desconocidos. Debido a su habilidad para identificar interacciones directas entre tres biomoléculas en células vivas, el SRET ofrece una valiosa técnica para identificar nodos y uniones, no tan solo en redes moleculares horizontales, sino también en cualquier tipo de interacción física proteína-proteína. En este sentido, una de las aplicaciones más interesantes de la técnica de SRET es la detección de la heteromerización entre GPCR. Por primera vez, se ha demostrado la heteromerización entre tres GPCR distintos (los complejos de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$ ) en células vivas. Tanto el SRET<sup>1</sup> como el SRET<sup>2</sup> han permitido la identificación del heterómero de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$ .

Para un nivel de expresión específico del receptor unido a la proteína luciferasa (*Rluc*), la eficiencia de SRET más elevada es observada cuando el dador de FRET es relativamente bajo y la expresión del aceptor de FRET es relativamente alta. Como se demuestra en este artículo, la especificidad del SRET puede ser demostrada mediante la utilización de controles negativos con las proteínas fluorescentes (GFP<sup>2</sup>, YFP o DsRed) sin fusionar con los receptores, mediante la utilización de mutantes cuya interacción con los otros receptores se vea alterada y/o mediante la

obtención de curvas de saturación de SRET. A partir de las curvas de saturación se puede determinar un  $SRET_{max}$  aparente y un  $SRET_{50}$  aparente, que poseen un significado similar a estos mismos parámetros deducidos de los ensayos de BRET (Mercier, et al., 2002). Hay que resaltar que el  $SRET_{max}$  y el  $SRET_{50}$  cambian cuando se utilizan diferentes relaciones de dador/aceptor de BRET. Este hecho recuerda a lo que ocurre en enzimología cuando se calcula la  $V_{max}$  y la  $K_M$  de una enzima que cataliza una reacción bisustrato, manteniendo la concentración de un sustrato constante y variando la concentración del otro. Para estas enzimas los valores calculados se conocen como “ $V_{max}$  aparente” y “ $K_M$  aparente”. En el mismo sentido, nosotros proponemos la denominación de “ $SRET_{max}$  aparente” y “ $SRET_{50}$  aparente”.

El SRET supone un avance significativo en el desarrollo de las técnicas de transferencia de energía biofísica para identificar interacciones de proteínas hasta el nivel de trímeros. Sin embargo, el SRET no es la única técnica que permite estudiar interacciones entre más de dos proteínas. En esta Tesis hemos utilizado los conocimientos adquiridos mediante el estudio del SRET para desarrollar la técnica de BRET con BiFC. La utilización de más de una técnica para determinar oligómeros es muy recomendable. Hay que recordar que las técnicas de transferencia de energía poseen una limitación, que consiste en su dependencia de la correcta orientación de las proteínas. Hecho que puede ocasionar falsos negativos, como por ejemplo ciertas interacciones de GPCR donde los extremos C-terminales de los receptores se encuentran muy alejados. En estas circunstancias sería de gran ayuda disponer de otra técnica de detección de heterotrímeros para verificar la falta de interacción entre estas proteínas.

En este sentido, basándonos en la aproximación previamente descrita por Héroux y colaboradores (Héroux, et al., 2007), en el trabajo **Detection of trimers of cannabinoid CB<sub>1</sub>, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer** se muestra que la combinación de las técnicas *Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)* y *Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)* resulta también muy útil para la determinación de heterómeros de tres GPCR distintos.

La técnica de BiFC se basa en la reconstitución de una proteína fluorescente (YFP) a partir de dos fragmentos no fluorescentes de dicha proteína (Michnik, 2001; Hu, et al., 2002). Estos fragmentos se encuentran fusionados a las dos proteínas de interés de manera que una lectura positiva de fluorescencia representa una evidencia de la interacción molecular de las dos proteínas en estudio (Kerppola, 2008). Utilizando células transfectadas con las subunidades de la proteína

heterotrimérica G:  $G_{\alpha n}YFP$  y  $G_{\beta c}YFP$  se ha demostrado la utilidad de esta técnica para detectar heterodímeros de proteínas. Se obtuvo un incremento en la fluorescencia a 530 nm al ir aumentando la cantidad de proteínas transfectadas. Como control negativo, no se detectó ninguna fluorescencia cuando se cotransfectaron las proteínas  $G_{\alpha n}YFP$  y  $cYFP$  o  $G_{\beta c}YFP$  y  $nYFP$ . Estos resultados prueban la capacidad de la técnica BiFC para detectar heterodímeros. Utilizamos la técnica BiFC para detectar heterodímeros entre receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$  en células HEK-293. La fusión de los fragmentos  $nYFP$  o  $cYFP$  a los receptores  $CB_1$  y  $A_{2A}$  no modificó la funcionalidad de ambos receptores, determinada mediante la fosforilación de ERK1/2. Las células transfectadas con  $CB_1RnYFP$  y  $A_{2A}RcYFP$  emitían fluorescencia a nivel de membrana plasmática. Sin embargo, no se detectó fluorescencia cuando las células fueron cotransfectadas con  $CB_1RnYFP$  y  $cYFP$  o  $A_{2A}RcYFP$  y  $nYFP$ , mostrando la especificidad de la señal. Además, los niveles de detección de fluorescencia se vieron incrementados al aumentar la cantidad de proteínas transfectadas. En conjunto, estos resultados validan la utilidad de la técnica BiFC para monitorizar la formación de heterómeros entre receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ .

Los resultados anteriormente descritos abrieron la posibilidad de combinar esta tecnología con la técnica *Bioluminescent Resonance Energy Transfer* (BRET) para investigar la existencia de heterooligómeros entre los receptores  $A_{2A}$ ,  $D_2$  y  $CB_1$ . En primer lugar, se investigó la viabilidad de la técnica en células que expresaban las proteínas de fusión de las tres subunidades de la proteína heterotrimérica G:  $G_Y-Rluc$ ,  $G_{\alpha n}YFP$  y  $G_{\beta c}YFP$ . Se obtuvo un BRET positivo entre  $G_Y-Rluc$  y el heterómero obtenido por complementación  $G_{\alpha n}YFP$ - $G_{\beta c}YFP$ . Incrementando la expresión de las proteínas  $G_{\alpha n}YFP$ - $G_{\beta c}YFP$  se obtuvo una curva hiperbólica de saturación de BRET.

Para detectar la posible formación de los heterooligómeros formados por los receptores  $CB_1$ ,  $D_2$  y  $A_{2A}$ , se transfectaron células HEK-293 con las proteínas de fusión  $D_2Rluc$ ,  $A_{2A}RcYFP$  y  $CB_1RnYFP$ . La fusión de la proteína  $Rluc$  al receptor  $D_2$  no modificó sus características funcionales, como se demuestra mediante la determinación de la fosforilación de ERK1/2. Además, las proteínas de fusión no vieron afectada la normal distribución subcelular de los receptores en la membrana plasmática de las células cotransfectadas y los niveles de expresión se mostraron en el rango fisiológico. Mediante la oxidación del sustrato coelenterazine H estas células cotransfectadas dieron una señal de BRET positiva y específica obteniéndose una curva hiperbólica de saturación al incrementar los niveles de expresión de  $A_{2A}RcYFP$ - $CB_1RnYFP$ . Como control negativo se utilizó como dador la proteína de fusión correspondiente al receptor  $D_4$  de dopamina,  $D_4Rluc$ , y no se obtuvo

ninguna señal de BRET. Estos resultados indican que los receptores  $A_{2A}$ ,  $D_2$  y  $CB_1$  forman, al menos, oligómeros de tres receptores en células vivas. Por tanto, la formación de heterotrímeros se puede demostrar mediante las nuevas técnicas de SRET y *BiFC* y *BRET*.

Actualmente, ha sido descrita la coexpresión de los receptores de dopamina  $D_2$  y de adenosina  $A_{2A}$  en las neuronas GABAérgicas estriatales (Ferré, et al., 2007) y la coexpresión de los receptores  $A_{2A}$  y  $CB_1$  de cannabinoides en estructuras estriatales fibrilares de rata (Carriba, et al., 2007). La demostración de los heterómeros de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$  en células transfectadas juntamente con la codistribución de dichos receptores en la membrana plasmática de las neuronas estriatales, sugiere que estos tres receptores están formando parte de redes moleculares. El hecho de que estos receptores constituyan un nodo de una red introduce un nivel de complejidad superior, ya que la activación de cualquiera de ellos puede influir en el funcionamiento de los otros receptores en el heterómero. Ello puede ser de especial importancia en el funcionamiento de estas neuronas en la enfermedad de Parkinson y en los estadios previos de la enfermedad de Huntington. Además, la neuroadaptación en las sinapsis glutamatérgicas de las neuronas encefalinérgicas GABAérgicas localizadas en el núcleo accumbens (la parte ventral del estriado) parece estar involucrada en el deseo compulsivo y la recaída al consumo de drogas (Kalivas, et al., 2005). Basándose en la acción antagónica entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  en el heterómero de receptores  $A_{2A}$ - $D_2$ , los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  están dando muy buenos resultados en pruebas clínicas en pacientes enfermos de Parkinson (Jenner, et al., 2005). Además, los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  están siendo considerados como posibles agentes terapéuticos en el estadio final de las drogas de abuso. Su eficacia clínica puede estar relacionada con la recientemente demostrada dependencia de la activación del receptor  $A_{2A}$  para la señalización del receptor  $CB_1$  en el heterómero de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$  en el estriado (Carriba, et al., 2007). Los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  se comportan como los antagonistas del receptor  $CB_1$ , contrarrestando la rehabilitación a diferentes drogas de abuso en animales de experimentación (De Vries y Schoffelmeer, 2005). En resumen, los resultados descritos por la bibliografía sugieren que el heterómero de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$  podría actuar como un procesador mediando los procesos computacionales neuronales necesarios para modular la neurotransmisión dopaminérgica estriatal.

Una vez establecida la formación de heterómeros de receptores  $A_{2A}$ - $CB_1$ - $D_2$  en células vivas, surgieron preguntas importantes que no tenían una respuesta clara, como por ejemplo ¿Cuál es la disposición de los protómeros en el heterómero (estructura cuaternaria)? ¿Qué tipo de determinantes moleculares están involucrados en el mantenimiento de

la estructura cuaternaria? ¿Cuál es la funcionalidad asociada a la estructura del heterómero?. Para avanzar en la búsqueda de respuestas a estas preguntas investigamos sobre la estructura cuaternaria del heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> y su funcionalidad.

En el trabajo **Electrostatic Interactions as Key Determinants of the Quaternary Structure of Receptor Heteromers** se muestra que los heterómeros de GPCR poseen propiedades funcionales que dependen de su estructura cuaternaria determinada, no tan solo por la interacción entre dominios transmembrana, sino también por interacciones entre dominios hidrofílicos intracelulares. En el heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> los protómeros adoptan una disposición triangular y cada protómero contiene dos dominios clave (positivos y/o negativos) para interaccionar de forma selectiva con los dominios intracelulares de los otros dos protómeros, mediante interacciones de carácter electrostático. Así, el receptor D<sub>2</sub> contiene dos epítomos ricos en Arg en el tercer bucle intracelular, <sup>215</sup>VLR<sup>RRRR</sup>KRVN<sup>224</sup> y <sup>266</sup>NRRRVEAARR<sup>275</sup> que interaccionan con residuos de serina o treonina, potencialmente fosforilados por acción de la caseína cinasa 1/2 (CK1/2), situados en el dominio C-terminal (Ser<sub>374</sub>) del receptor A<sub>2A</sub> o en el tercer bucle intracelular (Thr<sub>321</sub>-Ser<sub>322</sub>) del receptor CB<sub>1</sub> respectivamente. A su vez, el receptor CB<sub>1</sub> contiene dos residuos adyacentes de Ser y Thr en su tercer bucle intracelular (Thr<sub>321</sub> y Ser<sub>322</sub>) y en su dominio C-terminal (Thr<sub>467</sub> y Ser<sub>468</sub>), potencialmente fosforilados por CK1/2, que interaccionan con los residuos de Arg del tercer bucle intracelular (<sup>266</sup>NRRRVEAARR<sup>275</sup>) del receptor D<sub>2</sub> y con los residuos de Arg (Arg<sub>205</sub>-Arg<sub>206</sub>) del tercer bucle intracelular del receptor A<sub>2A</sub>, respectivamente. Finalmente, el receptor A<sub>2A</sub> contiene residuos de Arg al final de su TM5 (Arg<sub>205</sub>-Arg<sub>206</sub>) y residuos de Ser en su dominio C-terminal (Ser<sub>374</sub>), potencialmente fosforilados por CK1/2, que interaccionan con residuos fosforilados de Ser/Thr del dominio C-terminal del receptor CB<sub>1</sub> (Thr<sub>467</sub> and Ser<sub>468</sub>) y dominios ricos en Arg localizados en el extremo citoplasmático del TM5 del receptor D<sub>2</sub> (<sup>215</sup>VLR<sup>RRRR</sup>KRVN<sup>224</sup>), respectivamente. Estas interacciones, junto con interacciones entre hélices transmembrana, son importantes para el mantenimiento de la estructura cuaternaria de los heterómeros A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>, CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>. El hecho que cada uno de los receptores que constituyen los heterómeros formen interacciones electrostáticas entre residuos adyacentes de arginina y residuos de Ser y Thr fosforilados de los otros dos receptores sugiere que estas interacciones en particular podrían constituir un mecanismo general en la heteromerización de receptores.

Teniendo en cuenta estas interacciones, mediante modelaje molecular, se ha propuesto, por primera vez, la estructura de un trímero formado por tres GPCR diferentes. Al analizar los dominios de interacción entre los

receptores que cumplieran con las observaciones experimentales, los resultados son compatibles con los modelos propuestos para dímeros de otros GPCR de la familia A, en los que la oligomerización involucra principalmente la interacción entre las hélices TM4 y TM5. En este modelo se propone una disposición triangular de los receptores en la que se forman interacciones entre estas hélices y que es compatible con la existencia de homómeros de cada uno de los protómeros, en los que la TM1 constituye la interfase entre los homodímeros, lo que es un fenómeno descrito para GPCR (Klco, et al., 2003;Guo, et al., 2005;Guo, et al., 2008). Estos resultados abren una nueva perspectiva para entender la heteromerización de receptores, donde los receptores no sólo pueden formar heteromultímeros de tres protómeros, sino que también heterooligómeros o redes de receptores.

Se ha puesto de manifiesto que las interacciones entre los dominios intracelulares del receptor CB<sub>1</sub> y los dominios intracelulares de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> son fundamentales para la correcta formación de la estructura cuaternaria del heterómero A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>, necesaria para su correcta funcionalidad. Así, los receptores mutantes que no tienen los aminoácidos de interacción mostraron valores de RET alterados y, paralelamente, también se observaron cambios cualitativos en el patrón de señalización por la vía de las ERK1/2 al coactivarse los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>. El hecho de que una alteración de la estructura cuaternaria del heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> (como se demuestra con los experimentos de SRET) esté asociada a un cambio cualitativo significativo en la señalización indica que las interacciones electrostáticas entre los dominios intracelulares son determinantes para el desarrollo de las propiedades bioquímicas del heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>. Estas características bioquímicas y el patrón cualitativo específico de la activación de las MAPK podrían ser utilizados como una *huella dactilar* bioquímica para detectar la presencia del heterómero A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> en el estriado. Los experimentos con ratones *KO* para el receptor CB<sub>1</sub> han sido de gran importancia para reafirmar la existencia de heterómeros A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> en el estriado.

De entre las cuestiones importantes que se plantean al analizar la heteromerización de receptores está el conocer si existen proteínas citosólicas capaces de interactuar con ellos y modular su función. Una proteína candidata para interactuar con los heterómeros A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R es la calmodulina. La calmodulina es una proteína de unión de calcio capaz de interactuar con el receptor D<sub>2</sub> de dopamina (Bofill-Cardona, et al., 2000;Liu, et al., 2007;Woods, et al., 2008) y se sospechaba que también era capaz de interactuar con el receptor A<sub>2A</sub> de adenosina (Woods, et al., 2008). Con estos indicios se estudió la interacción de estos receptores

con la calmodulina en presencia o ausencia de calcio y se analizaron las implicaciones funcionales de esta interacción.

El calcio juega un papel importante en la fisiología de los organismos pluricelulares y se encuentra involucrado en la regulación de muchos procesos celulares. Diversos estímulos como la despolarización de la membrana o la unión de ligando a los receptores de membrana conducen a la obertura de los canales de calcio localizados en la membrana plasmática, resultando en un incremento significativo de los niveles de calcio en el citosol. Allí, las proteínas de unión a calcio actúan como sensores y mediadores de la señal iniciada por el calcio. La calmodulina (CaM) es una proteína de unión de calcio altamente conservada, soluble, intracelular, con un peso molecular de 15 kDa y conocida como el mayor transductor de la señal de calcio en células de mamíferos (Velter y Leclerc, 2003). La CaM se une directamente a los dominios citoplasmáticos de las proteínas de membrana, incluyendo los GPCR como el receptor  $\mu$ -opioide, el receptor 5-HT<sub>1A</sub> de serotonina, el receptor muscarínico de acetilcolina y el receptor D<sub>2</sub> de dopamina (Woods, et al., 2005; Belcheva, et al., 2001; Turner, et al., 2001; Lucas, et al., 2006). En el trabajo **Interactions between calmodulin, adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors** se muestra una clara evidencia de la interacción de la CaM con los receptores de adenosina A<sub>2A</sub> a través de la secuencia RIREFRQTFR presente en el extremo proximal del dominio C-terminal del receptor A<sub>2A</sub>. La CaM no tan sólo es capaz de interaccionar con los receptores individualmente, sino que también se forman complejos heteroméricos A<sub>2A</sub>R-CaM-D<sub>2</sub>R. A través de estos complejos el Ca<sup>2+</sup> modula la función del heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>.

Previamente a este estudio, se había descrito que un dominio rico en argininas de la parte N-terminal del tercer dominio intracelular del receptor D<sub>2</sub> estaba involucrado en la unión a la proteína G<sub>i/o</sub>, a la CaM y al receptor A<sub>2A</sub> (Ciruela, et al., 2004; Woods y Ferré, 2005; Bofill-Cardona, et al., 2000; Woods, et al., 2008; Senogles, et al., 2004). La unión de la calmodulina al receptor D<sub>2</sub> impide el acoplamiento del receptor a la proteína G<sub>i/o</sub>, y por lo tanto, inhibe la actividad adenilato ciclasa (Bofill-Cardona, et al., 2000). En este trabajo se describe la existencia de una competición entre la CaM y el receptor A<sub>2A</sub> por el mismo dominio del receptor D<sub>2</sub>, lo que se observa claramente cuando se utiliza la isoforma corta del receptor D<sub>2</sub>. Las dos isoformas del receptor D<sub>2</sub> (corta y larga, D<sub>2S</sub> y D<sub>2L</sub>, respectivamente), son generadas mediante *splicing* alternativo del mismo gen (Missale, et al., 1998). La isoforma D<sub>2L</sub> es la utilizada rutinariamente en este trabajo y contiene 29 aminoácidos adicionales en la porción del medio del tercer dominio intracelular. El epítipo rico en argininas del receptor D<sub>2</sub> [VLRRRRKRNV] que es capaz de interaccionar con el receptor A<sub>2A</sub>, es común en las dos isoformas del receptor D<sub>2</sub> y se

encuentra localizado en la parte N-terminal del largo tercer bucle intracelular (Ciruela, et al., 2004; Woods, et al., 2005). Además, únicamente en el tercer bucle de la isoforma D<sub>2L</sub> se encuentra un epítipo adicional también rico en argininas [VNRRRVEAA] que podría potencialmente interactuar con la CaM o con el receptor A<sub>2A</sub>. El péptido [VNRRRVEAA] es capaz de interactuar *in vitro* con la CaM y con la serina fosforilable del epítipo de la cola C-terminal del receptor A<sub>2A</sub> que se encuentra involucrado en la formación del heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>. En experimentos de competición de BRET con D<sub>2S</sub>R*Rluc*-CaMYFP la adición de cantidades crecientes del receptor A<sub>2A</sub> produce una disminución significativa de la señal de BRET. Es posible que en la isoforma D<sub>2L</sub>, la CaM se una preferentemente al epítipo [VLRRRRKRVN] y que la adición de cantidades crecientes del receptor A<sub>2A</sub> induzcan, primeramente, la translocación de la CaM al epítipo [VNRRRVEAA], produciendo un incremento en la señal de BRET. Al seguir aumentando los niveles de expresión del receptor A<sub>2A</sub>, éste también puede unirse al epítipo [VNRRRVEAA], con el consecuente desplazamiento de la CaM del receptor D<sub>2L</sub>. Los resultados de los experimentos de competición de BRET demuestran que un incremento en los niveles de expresión del receptor D<sub>2</sub> no modifica la señal de BRET entre las proteínas de fusión A<sub>2A</sub>R*Rluc* y CaMYFP. A la vez, incrementos de los niveles de expresión de la CaM no modifican la señal de BRET entre A<sub>2A</sub>R*Rluc* y D<sub>2</sub>RYFP. Estos resultados son compatibles con la posible formación del complejo A<sub>2A</sub>R-CaM-D<sub>2</sub>R, con el receptor A<sub>2A</sub> uniéndose simultáneamente a la CaM y al receptor D<sub>2</sub>. Este hecho se ha demostrado mediante el uso de la novedosa técnica de SRET que permite demostrar interacciones directas entre tres proteínas simultáneamente (Carriba, et al., 2008).

En este trabajo, también se ha puesto de manifiesto que la conformación y la funcionalidad del heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> están moduladas por el ión calcio. De hecho, la ionomicina, un ionóforo que puede incrementar los niveles intracelulares de calcio, fue capaz de modificar la transferencia de energía entre las proteínas de fusión A<sub>2A</sub>R*Rluc* y D<sub>2</sub>RYFP. Cambios en la transferencia de energía indican cambios conformacionales notorios. Por ejemplo, en el heterómero A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub>, utilizando la técnica de BRET no se detectaron variaciones de transferencia de energía mediante la exposición de los agonistas de los receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub> (Canals, et al., 2005). Para observar cambios conformacionales mediados por la unión de un agonista a un heterómero se precisan técnicas de transferencia de energía a tiempo real (Vilardegà, et al., 2008). Por consiguiente, los cambios de BRET detectados en presencia de Ca<sup>2+</sup> pueden corresponder a cambios estructurales notorios en los heterómeros A<sub>2A</sub>-CaM, CaM-D<sub>2</sub> y A<sub>2A</sub>-CaM-D<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren que el calcio, mediante la calmodulina,



podría ejercer un control sobre la función de los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  y de los heterómeros  $A_{2A}$ - $D_2$ . Efectivamente, este control se observa en la vía de señalización de las MAPK. Cuando no están formando heterómero, los receptores  $D_2$  y  $A_{2A}$  pueden interactuar con la calmodulina, y en el heterómero la calmodulina se une preferentemente al receptor  $A_{2A}$  y modula selectivamente la señalización vía MAPK. De hecho, el calcio modifica significativamente la fosforilación de ERK1/2 inducida por la activación de los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  en las células que los coexpresan. Además, la interacción antagónica, previamente descrita (Ferré, et al., 2008), entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  se ve potenciada por las variaciones de calcio inducidas por ionomicina. Estos resultados añaden más información sobre la función del heterómero  $A_{2A}$ R- $D_2$ R, considerado como foco para el desarrollo de agentes terapéuticos antiparkinsonianos.

Otra de las cuestiones importantes que se plantean al analizar la heteromerización de receptores es conocer si su expresión o función puede variar en ciertos estados patológicos como por ejemplo en la adicción a cocaína. Con objeto de estudiar este aspecto hemos investigado los efectos de la cocaína sobre la expresión de los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  en el cerebro. Por un lado, las vías dopaminérgicas están profundamente implicadas en la adicción a cocaína (Kalivas, et al., 2007). Por otro lado, datos farmacológicos han demostrado una fuerte implicación del receptor  $A_{2A}$  en la modulación de los efectos mediados por la cocaína. Por ejemplo, los antagonistas del receptor  $A_{2A}$  pueden reinstaurar la adicción a cocaína (Weerts, et al., 2003), mientras que los agonistas pueden atenuar los efectos de reinserción a la cocaína (Knapp, et al., 2001). De forma importante, Filip y colaboradores han descrito que la estimulación de los receptores  $A_{2A}$  protege contra el desarrollo y la expresión de la sensibilización a los efectos estimulantes motores de la cocaína (Filip, et al., 2006). Con la demostración de la formación de los heterómeros  $A_{2A}$ R- $D_2$ R en el estriado (Hillion, et al., 2002; Canalts, et al., 2003; Nakata, et al., 2005; Fuxe, et al., 2005), nosotros nos cuestionamos si la interacción entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  estaría involucrada en la adicción a cocaína.

En el trabajo **Increase in  $A_{2A}$  receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal** se han utilizado ratas sometidas a un sofisticado protocolo de autoadministración de cocaína seguida de periodos de abstinencia, para investigar si la expresión de los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  se ve alterada en un espacio de tiempo que involucra cambios en la motivación por la autoadministración de cocaína. Al analizar la expresión de los receptores mediante ensayos de unión de un antagonista del receptor  $A_{2A}$  y experimentos de detección inmunológica, se puso de manifiesto un notorio incremento en la densidad del receptor  $A_{2A}$  funcional en el núcleo

accumbens después de la autoadministración de cocaína durante 10 días. Estos resultados parecen ser específicos del núcleo accumbens ya que si bien la inmuno-reactividad del receptor  $A_{2A}$  se incrementa también en la parte anterior del estriado dorsal, este incremento no está asociado a un mayor número de centros de unión de antagonista, es decir, a receptores  $A_{2A}$  funcionales. Al analizar la parte posterior del estriado dorsal se detectaron decrementos tanto en la inmuno-reactividad del receptor  $A_{2A}$  como en el número de centros de unión de antagonista en ratas adictas. Por otra parte no se encontraron cambios en el córtex prefrontal ni en el hipocampo. El incremento de los receptores  $A_{2A}$  en el núcleo accumbens puede constituir un mecanismo compensatorio para contrarrestar el efecto de la cocaína. De hecho la cocaína incrementa los niveles de dopamina en el estriado y aumenta la señalización de los receptores  $D_2$ . Dada la existencia de la interacción antagónica entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$ , el incremento de receptores  $A_{2A}$  podría mitigar la estimulación de los receptores  $D_2$  en ratas cocainómanas (Fuxe, et al., 2005).

Cuando las ratas cocainómanas se someten a una abstinencia de 7 días se produce una mayor eficacia de la cocaína en ejercer sus efectos (Morgan, et al., 2002 a,b) y en este periodo se observa que la expresión de los receptores  $A_{2A}$  en el núcleo accumbens revierte hasta el nivel basal. Este efecto también es específico ya que el decremento de los receptores  $A_{2A}$  en la parte posterior del estriado dorsal persiste en el periodo de retirada de cocaína estudiado. En el estriado dorsal, la regulación diferencial de la cocaína en la zona posterior respecto la anterior puede estar relacionada con la pequeña cantidad de receptores  $A_{2A}$  estimulando la liberación de glutamato en la parte posterior del estriado dorsal (Blue, et al., 2003). Este hecho sería compatible con una gran actividad de los receptores  $D_2$ , estimulados por el incremento de dopamina inducido por la cocaína en el espacio extracelular, lo que resultaría en la inhibición de la liberación de glutamato en los terminales corticoestriatales.

Se ha descrito que se requiere una transmisión glutamatérgica intacta para que tenga lugar una regulación compensatoria de los receptores  $A_{2A}$  en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales después de la autoadministración de cocaína. Este hecho se debe a que una reducción en la transmisión de glutamato mediante los receptores mGlu5 y NMDA reduce la actividad de las cinasas dependientes del complejo calcio-calmodulina y de las MAP cinasas (Ferré, et al., 2003). Así, se ve reducida la fosforilación del factor de transcripción de CREB, que es el encargado de la unión y activación del promotor del receptor  $A_{2A}$  (Chiang, et al., 2005). Por consiguiente, la interacción antagónica  $A_{2A}$ - $D_2$  puede no estar incrementada en esta región, aunque sí reducida debido a la disminución de la actividad sináptica glutamatérgica, provocando una

disminución de la expresión génica de los receptores  $A_{2A}$ . Esta reducción puede resultar en un incremento de la señalización del receptor  $D_2$  y contribuir a las propiedades adictivas de la cocaína. Sin embargo, en este estudio no se ha detectado ningún cambio en la densidad y afinidad de los receptores  $D_2$  funcionales en la parte dorsal del estriado en ningún grupo de animales. Esto no apoya la hipótesis del incremento de señalización de los receptores  $D_2$  debido a un aumento del número de receptores. La parte dorsal del estriado está involucrada en el comportamiento habitual y en los efectos de ansiedad producidos por la cocaína (Robbins y Everitt, 2002;Vanderschuren, et al., 2005;Wong, et al., 2006). La reducción del receptor  $A_{2A}$  no se ve alterada al retirarse la cocaína y por lo tanto, no se encuentra principalmente involucrada en el aumento de los efectos de refuerzo de la cocaína después de siete días de abstinencia (Morgan, et al., 2002a,b;2004).

Del conjunto de resultados el hecho más interesante a destacar es que la autoadministración de cocaína puede estar asociada con un aumento de los receptores  $A_{2A}$  en el núcleo accumbens, una zona crítica para las primeras respuestas de recompensa y de adicción a drogas de abuso (Robbins y Everitt, 2002;Kalivas, et al., 2005). Debido a la existencia de la interacción antagónica entre los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  en las partes ventral y dorsal del estriado, principalmente en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales (Fuxe, et al., 2005), el aumento compensatorio de la expresión y señalización de los receptores  $A_{2A}$  puede contrarrestar el aumento de la señalización del receptor  $D_2$  producido por el aumento de los niveles de dopamina en el espacio extracelular inducido por la cocaína (Andrews y Lucki, 2001). De acuerdo con esta observación, es sabido que existe un lugar de unión del elemento de respuesta a AMPc (CRE) atípico en el centro del promotor del gen del receptor  $A_{2A}$  (Chiang, et al., 2005) y CREB reduce los efectos de recompensa de la cocaína en el núcleo accumbens (Carlezon, et al., 1998;Mattson, et al., 2005). El conjunto de todos estos resultados muestra que un posible incremento en la fosforilación de CREB producido por la autoadministración de cocaína puede provocar un aumento en la expresión génica del receptor  $A_{2A}$  y resultar en un aumento de la antagonización de la señalización del receptor  $D_2$  mediante la interacción antagónica de los receptores  $A_{2A}$ - $D_2$  a nivel de membrana y del citoplasma. Sin embargo, la sobreexpresión del receptor  $A_{2A}$  puede actuar mediante otros mecanismos, incluyendo el aumento en la formación de homómeros de  $A_{2A}$ , y por lo tanto, aumentando la excitabilidad de estas neuronas (Antonelli, et al., 2006). Otro mecanismo puede ser la habilidad de la activación persistente del receptor  $D_2$ , para sensibilizar la señalización del receptor  $A_{2A}$  a nivel de adenilato ciclasa mediante la separación de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína heterotrimérica G activada (Vortherms y Watts, 2004). Finalmente,

debería ser considerado que el aumento del receptor  $A_{2A}$  y la reversión de este fenómeno durante el periodo de abstinencia podrían tener un efecto modulador en la eficacia de la cocaína, provocando cambios en la fosforilación de las proteínas de unión a actina y por consiguiente cambios en el ciclo de la actina, que es importante para la plasticidad de las dendritas (Carlisle y Kennedy, 2005). De hecho, la abstinencia a la cocaína provoca un incremento del ciclo de la actina en el núcleo accumbens que puede modular el restablecimiento de la drogadoicción a la cocaína (Toda, et al., 2006; Kalivas, et al., 2005).

Mediante experimentos de unión de radioligandos y western-blot en ratas cocainómanas sometidas a un día o siete días de abstinencia se puso de manifiesto que en el núcleo accumbens se produce un incremento en los centros de unión y en el valor de  $K_d$  para  $[^3H]$ -raclopride sin que se detectaran incrementos de inmunoreactividad del receptor  $D_2$ . Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden ser explicados si se produce un aumento en la densidad del receptor  $D_3$  en el núcleo accumbens después de la retirada de la cocaína. El receptor  $D_3$  es también un antagonista ya que tiene una ligeramente más baja afinidad para el raclopride que los receptores  $D_2$  (Seeman y Van Tol, 1994). Esta hipótesis de que un incremento de la unión de  $[^3H]$ -raclopride es debido a un incremento de expresión del receptor  $D_3$  se sustenta en unos resultados publicados por Neisewander (Neisewander, et al., 2004) donde se describen incrementos en la unión del receptor  $D_3$  en sub-regiones del estriado de ratas con autoadministración de cocaína después de una abstinencia por diferentes tiempos. Este incremento de los receptores  $D_3$  durante la abstinencia puede estar asociado a un incremento de la necesidad de cocaína (Tran-Nguyen, et al., 1998). Así, un aumento de la señalización del receptor  $D_3$  en el núcleo accumbens después de la retirada de la cocaína puede contribuir al incremento de la eficacia de la cocaína en estos estados, ya que los antagonistas del receptor  $D_3$  pueden reducir la adicción a cocaína (Borrel, et al., 2002; Joyce y Millan, 2005). Por otra parte, la cocaína incrementa la liberación de BDNF, que podría estar involucrado en el aumento de la expresión del receptor  $D_3$  (Le Foll, et al., 2005). Una sobreexpresión de los receptores  $D_3$  ha sido observada en los circuitos de recompensa de las personas adictas a la cocaína (Staley y Mash, 1996; Segal, et al., 1997).

Se ha descrito que los heterómeros entre receptores  $A_{2A}$ - $D_3$  pueden existir en el núcleo accumbens donde la activación del receptor  $A_{2A}$  antagoniza la señalización de los receptores  $D_3$  (Torvinen, et al., 2005). Además, la reducción del ratio  $D_2$ -like/ $A_{2A}$  en el núcleo accumbens puede significar no solamente un aumento de la señalización de los receptores  $A_{2A}$  por encima de los receptores  $D_2$ , sino también de la señalización de los receptores  $D_3$  en el núcleo accumbens. Así, una reducción de la

interacción antagónica  $A_{2A}/D_3$  en el núcleo accumbens puede contribuir al aumento de la motivación para la autoadministración de cocaína en el grupo de animales con siete días de abstinencia.

No se observaron cambios significativos en los niveles de expresión del receptor  $D_2$  en el estriado dorsal en el grupo de animales con diez días de alto consumo de cocaína. Éste es un descubrimiento importante que indica que cambios en la expresión de los receptores  $D_2$  en esta zona del cerebro no están involucrados en la adaptación de la respuesta a los efectos de recompensa de la cocaína en este modelo. Recientemente, cambios bifásicos en los receptores  $D_2$  en el *core* del núcleo accumbens han sido observados después de una retirada de pocos días de acceso a cocaína intravenosa (Ben-Shahar, et al., 2007). Parece ser, que la dosis y la exposición a la cocaína son las responsables de estas diferencias. La autoadministración crónica de cocaína en monos *rhesus* por periodos de varios meses provoca una disminución de la densidad del receptor  $D_2$  en el estriado detectada por autoradiografía (Moore, et al., 1998; Nader, et al., 2002). Mediante estudios de imágenes se ha podido detectar una disminución en la cantidad de receptores  $D_2$  en humanos adictos a la cocaína comparado con los sujetos controles (Volkow, et al., 1993; Martínez, et al., 2004). De forma similar, mediante la técnica de PET se ha observado una reducción en los receptores  $D_2$  en primates con autoadministración crónica de cocaína y un año de abstinencia (Morgan, et al., 2002 a, b; Nader, et al., 2006). Una persistente disminución de los receptores  $D_2$  en el estriado puede involucrar la internalización de los receptores  $D_2$  después de una autoadministración crónica de cocaína. Por lo tanto, es posible que una reducción de la densidad de los receptores  $A_{2A}$  y  $D_2$  en la parte posterior del estriado dorsal, con una significativa reducción de los niveles de expresión del receptor  $A_{2A}$ , observados después de una extensa autoadministración de cocaína y su retirada, pueden ser explicados mediante una co-internalización del heterómero  $A_{2A}-D_2$  en esta zona del cerebro.

En conjunto, los resultados evidencian un posible papel de interacciones antagónicas entre los receptores  $A_{2A}/D_2$  y una posible interacción antagónica entre los receptores  $A_{2A}/D_3$  en el núcleo accumbens en la prevención del desarrollo de la adicción a cocaína. Estos datos abren la posibilidad de una posible utilización de los agonistas del receptor  $A_{2A}$  como antagonistas de la cocaína para prevenir la adicción.

Simultáneamente al estudio de la expresión de receptores de adenosina y de dopamina en animales que se autoadministran cocaína, se llevó a cabo un estudio del efecto de la cocaína sobre receptores de dopamina a nivel más molecular, es decir más *in vitro*. En este sentido empezamos por estudiar el efecto de la cocaína sobre los receptores  $D_1$  de dopamina a nivel celular. El objetivo del estudio era identificar moléculas biológicas

que actúan en la acción de la cocaína en un primer término. En este sentido, nos planteamos investigar si podía haber otras vías de interacción de la cocaína con las vías dopaminérgicas, además del mecanismo molecular de interacción de la cocaína con el transportador de dopamina, DAT.

Es bien sabido que la cocaína exhibe múltiples efectos sobre la transmisión dopaminérgica. El estudio de estos efectos ha sido realizado, básicamente, en el campo de la drogadicción, analizándose la conducta (abstinencia, deseo, necesidad...) y los efectos bioquímicos (cambios en la transducción de señal) y genéticos (cambios en la actividad de algunos genes específicos) que pueden aparecer después de una toma de cocaína más o menos prolongada en humanos y en modelos animales. Mediante este tipo de investigación, se ha conseguido mejorar considerablemente el conocimiento sobre la acción a largo plazo de la cocaína, aunque se sabe muy poco sobre los primeros mecanismos moleculares que tienen lugar con la presencia de cocaína, con la excepción de la interacción de la cocaína con DAT. En este contexto, se desconocía totalmente que la cocaína era capaz de modular la transmisión dopaminérgica mediante la interacción con una de sus proteínas de unión, el receptor sigma-1. En el trabajo **Cocaine binding to sigma-1 receptors in the dopamine D<sub>1</sub>-sigma-1 receptor heteromer modulates dopamine D<sub>1</sub> receptor function** describimos por primera vez que los receptores sigma-1 y los receptores D<sub>1</sub> de dopamina pueden heteromerizar en células vivas y que la unión de la cocaína al receptor sigma-1 modula la función del receptor D<sub>1</sub> de dopamina no tan solo en células vivas, sino también en cortes de estriado de cerebro.

Aunque originalmente se propuso como un subtipo de receptor opioide, actualmente, se ha confirmado que el receptor sigma-1 es un receptor no-opioide que se une a distintas clases de drogas psicotrópicas incluyendo la cocaína (Mesangeau, et al., 2008). Aun así, su función en la señalización celular no se conoce muy bien. A nivel celular, las acciones agudas mediadas por los receptores sigma-1 incluyen la modulación de canales iónicos (como por ejemplo los canales de K<sup>+</sup>, los receptores NMDA o los receptores IP3) (Hayashi y Su, 2005). Debido a que esta proteína asociada al retículo endoplasmático (Alonso, et al., 2000) no mantiene ninguna homología con ninguna proteína de mamíferos, la cuestión de cómo realiza la transmisión de señal a sus canales diana resulta intrigante. Aydar y colaboradores han descrito que el receptor sigma-1 modula los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje mediante una interacción proteína-proteína con los canales Kv1.4 (Aydar, et al., 2002). En este trabajo, nosotros describimos un mecanismo similar mediante el cual los receptores sigma-1 modulan los receptores D<sub>1</sub>.

Mediante experimentos de BRET hemos demostrado que los receptores sigma-1 forman heterómeros con los receptores D<sub>1</sub> en células vivas. De hecho, de acuerdo con la naturaleza homodimérica de los receptores D<sub>1</sub> de dopamina (Ng, et al., 1994; George, et al., 1998; Kong, et al., 2006), se ha podido demostrar, mediante la combinación de las técnicas de BRET y BiFC, la existencia de complejos oligoméricos formados por un mínimo de un dímero de receptores D<sub>1</sub> y un receptor sigma-1 (complejos heteroméricos D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1). La coexpresión de ambas proteínas resulta en una alteración de la distribución subcelular del receptor sigma-1, desde una distribución punteada, correspondiente a una proteína asociada al retículo endoplasmático, a una mayor localización en la membrana plasmática donde se encuentra expresado el receptor D<sub>1</sub>, lo que está de acuerdo con una interacción molecular entre sigma-1 y los receptores D<sub>1</sub>. Se ha descrito que la cocaína, al interactuar con los receptores sigma-1, puede provocar la disociación de la proteína unida al citoesqueleto, ankyrin, de los receptores de inositol (1,4,5)-trifosfato en el retículo endoplasmático dando lugar a la formación del complejo sigma-1-ankyrin, que seguidamente transloca hacia la membrana plasmática (Su y Hayashi, 2002; Hayashi y Su, 2001, 2003a, 2003b). De acuerdo con esta redistribución subcelular del receptor sigma-1 inducida por cocaína, nosotros observamos un aumento de la expresión del receptor sigma-1 y de la colocalización de los receptores sigma-1 y D<sub>1</sub> en la membrana plasmática de células tratadas con cocaína. Estos resultados sugieren que la cocaína puede inducir un incremento de los heterómeros de los receptores D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1 a nivel de membrana plasmática.

Hemos demostrado que la unión de la cocaína al receptor sigma-1 en el heterómero de receptores D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1 resulta en una modificación estructural de los homómeros de los receptores de dopamina. De hecho, la cocaína modifica la estructura cuaternaria de los dímeros de los receptores D<sub>1</sub> de dopamina en el heterotrímero D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1, ya que provoca una disminución de la señal de BRET debida a una reducción de la transferencia de energía entre las proteínas *Rluc* y YFP, localizadas en el dominio C-terminal de los receptores D<sub>1</sub>. Estos cambios estructurales tienen lugar en paralelo con cambios en la función de los receptores D<sub>1</sub>. La unión de la cocaína a los receptores sigma-1 aumenta considerablemente la señalización por AMPc inducida por agonistas del receptor D<sub>1</sub>. Este efecto sobre el receptor D<sub>1</sub>, puede constituir, al menos en parte, la base molecular mediante la cual la cocaína potencia la señal de la adenilato ciclasa y la proteína quinasa A. De hecho, ha sido descrito que en animales sensibilizados según pautas de comportamiento, la supersensibilidad de los receptores D<sub>1</sub> tiene lugar en el núcleo accumbens. Este hecho afecta la cascada de señalización por debajo de la proteína G<sub>s</sub> e induce la potenciación de la señalización vía adenilato ciclasa y proteína quinasa A, con la consecuente fosforilación del factor de

transcripción CREB y la expresión de los genes tempranos como Fos, Jun y  $\Delta$ FosB (ver Anderson y Pierce, 2005; Chen, et al., 2009).

Hemos observado que la cocaína también es capaz de modular la fosforilación de ERK1/2 inducida por agonistas del receptor D<sub>1</sub>. La unión de la cocaína al receptor sigma-1 o la unión del agonista del receptor D<sub>1</sub> incrementa los niveles de fosforilación de ERK1/2 en células vivas que expresan el receptor D<sub>1</sub> pero no en células que no lo expresan. Cabe resaltar que, no solamente el antagonista del receptor sigma-1, sino también el antagonista del receptor D<sub>1</sub> contrarrestan tanto el efecto inducido por la cocaína como el efecto inducido por los agonistas del receptor D<sub>1</sub>. Estos resultados sugieren que la cocaína y el agonista del receptor D<sub>1</sub> se unen al heterómero de receptores D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1, en el que la unión de un antagonista a una de las unidades del heterómero puede inducir cambios conformacionales en las otras unidades y bloquear las señales específicas generadas en el heterómero. En células vivas, la fosforilación de ERK1/2 inducida por la cocaína, se observa a tiempos cortos de tratamiento con cocaína (10 min) aunque el efecto máximo se obtiene a los 30 min. Ello sugiere que en esta activación no solamente se ve involucrada la interacción de la cocaína con el receptor sigma-1, sino también, el incremento de heterómeros de receptores D<sub>1</sub>-D<sub>1</sub>-sigma-1 en la membrana plasmática, debido a la redistribución subcelular del receptor sigma-1 inducida por la cocaína. Un hecho destacable es que se produce una interacción negativa entre la cocaína y el agonista del receptor D<sub>1</sub> en la fosforilación de ERK1/2 en células vivas y en cortes de estriado de ratón. La fosforilación de ERK1/2 inducida por el agonista del receptor D<sub>1</sub> revierte prácticamente cuando la estimulación mediante agonista tiene lugar en células o cortes estriatales pretratados con cocaína. La fosforilación de ERK 1/2 inducida por cocaína y la modulación negativa de los receptores D<sub>1</sub> por cocaína están mediadas por el receptor sigma-1 ya que no se observan en los cortes de estriado de ratón *KO* para sigma-1. La modulación negativa de los receptores D<sub>1</sub> mediada por la unión de la cocaína al receptor sigma-1 no está relacionada con la fosforilación de ERK1/2 en un grupo de neuronas de regiones del cerebro relacionadas con los efectos de recompensa en ratones expuestos a la toma de cocaína (Lu, et al., 2006; Girault, et al., 2007). Esta acción de activación a largo plazo de la cocaína depende de los receptores de dopamina D<sub>1</sub>, aunque también de otros receptores incluyendo los receptores de glutamato (Schumann y Yaka, 2009; Boudreau, et al., 2009; Narasimhaiah, et al., 2009) e involucra la señalización vía AMPc/proteína quinasa A/DARPP32 (Valjent, et al., 2005, 2009). Esto puede representar un punto de integración entre los inputs glutamatérgicos procedentes de las regiones cortical y límbicas y los inputs dopaminérgicos (principalmente dependientes del receptor D<sub>1</sub>) procedentes del núcleo mesolímbico (Fasano, et al., 2009).



En su conjunto estos resultados demuestran, por primera vez, que los receptores sigma-1 y D<sub>1</sub> de dopamina pueden formar heterómeros en células vivas, lo que constituye la base mediante la cual la cocaína puede modular la estructura y funcionalidad de los receptores de dopamina D<sub>1</sub>. Mediante su interacción con los receptores sigma-1, un efecto a corto plazo de la cocaína es el de focalizar la señalización de los receptores D<sub>1</sub> hacia la vía del AMPc y, consecuentemente, inducir un incremento en la actividad de las neuronas que proyectan del núcleo accumbens al área ventral-tegmental, que se encuentran estrictamente limitadas a las neuronas que expresan el receptor D<sub>1</sub> (Anderson y Pierce, 2005). Y así, podrían activarse otras vías de señalización involucradas en los efectos a largo plazo de la cocaína. En conjunto, nuestros resultados describen un nuevo mecanismo mediante el cual los efectos de la cocaína pueden modular a corto plazo la transmisión dopaminérgica.



## **CONCLUSIONES**



. Se ha diseñado y puesto a punto una nueva técnica basada en la transferencia de energía de resonancia que permite detectar heterómeros formados por tres proteínas. La técnica de SRET (Secuencial Resonante Energy Transfer) combina de manera secuencial las técnicas de BRET y de FRET. SRET requiere de la co-expresión de tres proteínas, una fusionada a la enzima *Renilla Luciferasa* (*Rluc*) y las otras dos a variantes de la proteína fluorescente verde. La oxidación de un sustrato de la *Rluc* emite a una determinada  $\lambda$  que excita a una de las proteínas fusionada a GFP<sup>2</sup> (SRET<sup>2</sup>) o a YFP (SRET<sup>1</sup>), a su vez, la emisión de esta segunda proteína de fusión produce la excitación de la tercera proteína fusionada a YFP (SRET<sup>2</sup>) o a DsRed (SRET<sup>1</sup>) cuya emisión es la que se detecta. Esta técnica se ha revelado muy útil para la detección de heterómeros formados por tres receptores para distintos neurotransmisores y puede ser valiosa para entender, a nivel molecular, la integración de las señales en el SNC.

. Se ha diseñado y puesto a punto una nueva técnica que combina la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET) con la fluorescencia de complementación bimolecular (BiFC) y que permite detectar heterómeros formados por tres proteínas. Esta técnica de BRET/BiFC requiere la co-expresión de una proteína fusionada al enzima *Renilla Luciferasa* y de las otras dos proteínas fusionadas, respectivamente, al fragmento N-terminal o C-terminal de la proteína fluorescente YFP. La oxidación de un sustrato del enzima emite a una determinada  $\lambda$  que excita al aceptor constituido por la complementación de los fragmentos de la YFP que ocurre siempre y cuando las dos proteínas de fusión interaccionen. Esta técnica resulta de gran interés para la identificación de redes de receptores neuronales en los circuitos locales.

. Mediante las técnicas de SRET y de BRET/BiFC se ha puesto de manifiesto, por vez primera, la formación de un complejo heterotrimérico constituido por receptores de adenosina A<sub>2A</sub>, de cannabinoides CB<sub>1</sub> y de dopamina D<sub>2</sub> en células vivas.

. La combinación de las técnicas de SRET<sup>2</sup> y de BRET<sup>1</sup> y BRET<sup>2</sup> en células que expresan receptores de adenosina A<sub>2A</sub>-*Rluc*, cannabinoides CB<sub>1</sub>-YFP y dopamina D<sub>2</sub>-GFP<sup>2</sup> ha permitido establecer que en el heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>, los protómeros adquieren una disposición triangular. Se ha propuesto un modelo de estructura cuaternaria para el heterómero de receptores A<sub>2A</sub>-CB<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> que es el

primer modelo que se propone para heterotrímeros de receptores acoplados a proteína G. En la estructura cuaternaria, además de las hélices de transmembrana, intervienen interacciones electrostáticas entre dominios intracelulares muy conservados de los receptores. En estas interacciones intervienen puentes salinos entre epítopos ricos en arginina y grupos fosforilados de serina o treonina. Estas interacciones electrostáticas en particular podrían constituir un mecanismo general en la heteromerización de receptores.

. La mutación de los dominios intracelulares que intervienen en la estabilización de la estructura cuaternaria del heterómero de receptores adenosina  $A_{2A}$ -cannabinoides  $CB_1$ -dopamina  $D_2$  produce cambios en la estructura del heterómero y también en la función, concretamente en la señalización vía MAPK. Estos cambios se han utilizado como huella dactilar para detectar la presencia de estos heterómeros en estriado de cerebro de ratón.

. La proteína de unión de calcio, calmodulina (CaM), interacciona con dominios hidrofílicos intracelulares de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  y de dopamina  $D_2$ . Mediante técnicas de transferencia de energía de resonancia se ha obtenido evidencia de la formación de oligómeros  $A_{2A}$ -CaM- $D_2$  en los que la CaM se une preferentemente al receptor  $A_{2A}$  en un epítipo localizado en su dominio C-terminal. La unión de  $Ca^{+2}$  a la CaM induce cambios estructurales en el heterómero que provocan la modulación de la señalización vía MAPK inducida por los agonistas de los receptores.

. La auto-administración de cocaína en ratas da lugar a una sobreexpresión de los receptores  $A_{2A}$  de adenosina funcionales en el núcleo accumbens, sin que se detecten cambios en la expresión o la funcionalidad de los receptores de dopamina  $D_2$ . La sobreexpresión del receptor  $A_{2A}$  vuelve a los niveles normales después de la privación de cocaína. Durante el periodo de privación no se observan cambios en la expresión proteica de los receptores  $D_2$  en el núcleo accumbens; sin embargo, se observa un incremento de centros de unión de un agonista de la familia  $D_2$ -like de receptores de dopamina, lo que sugiere que se produzca una sobreexpresión de receptores  $D_3$  de dopamina en estas condiciones. Los agonistas de los receptores de adenosina  $A_{2A}$  podrían actuar como antagonistas de los efectos de la cocaína en el núcleo accumbens antagonizando la señalización de los heterómeros  $A_{2A}$ - $D_2$  y  $A_{2A}$ - $D_3$ .

. Se ha puesto de manifiesto, por vez primera, que los receptores sigma-1 pueden heteromerizar con homodímeros de receptores de dopamina D<sub>1</sub> en células vivas. La coexpresión de ambos receptores resulta en una redistribución subcelular del receptor sigma-1 del retículo endoplasmático a la membrana plasmática, que se ve incrementada por la presencia de cocaína. La unión de la cocaína al receptor sigma-1 induce cambios estructurales y funcionales en el heterómero. La cocaína, mediante su unión a sigma-1, potencia la señalización vía AMPc; sin embargo, en células vivas y en cortes estriatales de cerebro de ratón se observa un cross-talk negativo entre la cocaína y los agonistas del receptor D<sub>1</sub> en la fosforilación de ERK 1/2. La cocaína, interaccionando con sigma-1, es capaz de focalizar la señalización inducida por agonistas de receptores D<sub>1</sub> de dopamina hacia la vía AMPc/PKA, lo que abre nuevas perspectivas en el entendimiento de las acciones a corto plazo de esta droga.





**ANEXOS**



## 6.1 Colaboraciones

En el transcurso de la elaboración de la presente Tesis doctoral se ha colaborado en el siguiente manuscrito:

6.1.1 Laura Martínez, Pilar Lucas, **Gemma Navarro**, Ana I. Checa, Rafael Franco, Carlos Martínez, José Miguel Rodríguez y Mario Mellado. **Regulación dinámica de los homodímeros y heterodímeros entre los receptores CXCR1 y CXCR2.**

Manuscrito publicado en *The Journal of Immunology*.



## 6.2 Participación en artículos de revisión

Mediante el uso de algunos de los resultados experimentales obtenidos en esta Tesis doctoral se han escrito las siguientes revisiones:

6.2.1 Sergi Ferré, Amina S. Woods, **Gemma Navarro**, Marisol Aymerich, Carme Lluís y Rafael Franco. **Modulación mediante calcio de la estructura cuaternaria y función de los heterómeros de receptores A<sub>2A</sub> y D<sub>2</sub>.**

Manuscrito publicado en *Current Opinion in Pharmacology*.

6.2.2 Sergi Ferré, Carme Lluís, Zuzana Justinova, César Quiroz, Marco Orru, **Gemma Navarro**, Rafael Franco y Steven R. Goldberg. **Interacciones entre los receptores de adenosina y cannabinoides. Implicaciones en la función del estriado.**

Manuscrito aceptado para su publicación en *British Journal of Pharmacology*.



## BIBLIOGRAFÍA





- Abbraccio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA and Cattabeni F (1995) G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* **48**:1038-1045.
- AbdAlla S, Lothar H and Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407**:94-98.
- Adell A and Artigas F (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* **28**:415-431.
- Adjobo-Hermans MJ, Goedhart J and Gadella TW, Jr. (2006) Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of Galpha and Ggamma and do not dissociate upon activation. *J Cell Sci* **119**:5087-5097.
- Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R and Fuxe K (2003) Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* **55**:509-550.
- Alexander GE and Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**:266-271.
- Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoual M and Maurice T (2000) Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* **97**:155-170.
- Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* **58**:315-348.
- Andersson M, Usiello A, Borgkvist A, Pozzi L, Dominguez C, Fienberg AA, Svenningsson P, Fredholm BB, Borrelli E, Greengard P and Fisone G (2005) Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J Neurosci* **25**:8432-8438.
- Andrews CM and Lucki I (2001) Effects of cocaine on extracellular dopamine and serotonin levels in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* **155**:221-229.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairet S, Chelsky D, Dennis M and Bouvier M (2000) Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:3684-3689.
- Antle MC, Steen NM and Mistleberger RE (2001) Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *Neuroreport* **12**:2901-2905.

- Antonelli T, Fuxe K, Agnati L, Mazzoni E, Tanganelli S, Tomasini MC and Ferraro L (2006) Experimental studies and theoretical aspects on A2A/D2 receptor interactions in a model of Parkinson's disease. Relevance for L-dopa induced dyskinesias. *J Neurol Sci* **248**:16-22.
- Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA and Jackson MB (2002) The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* **34**:399-410.
- Bai M, Trivedi S and Brown EM (1998) Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* **273**:23605-23610.
- Bailey A, Gianotti R, Ho A and Kreek MJ (2005) Persistent upregulation of mu-opioid, but not adenosine, receptors in brains of long-term withdrawn escalating dose "binge" cocaine-treated rats. *Synapse* **57**:160-166.
- Baker RE, Yates CA and Erban R (2009) From Microscopic to Macroscopic Descriptions of Cell Migration on Growing Domains. *Bull Math Biol*.
- Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, Schmauss C, Zakharenko SS, Zablow L and Sulzer D (2004) Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* **42**:653-663.
- Baneres JL and Parello J (2003) Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol* **329**:815-829.
- Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, Favit A, Bibbiani F, Gillespie M, Morris MJ, Mouradian MM and Chase TN (2003) Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* **61**:293-296.
- Baraldi PG, Pavani MG, Leung E, Moorman AR, Varani K, Vincenzi F, Borea PA and Romagnoli R (2006) Synthesis and biological characterization of [3H] (2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-3-yl)-(4-chlorophenyl)-methanone, the first radiolabelled adenosine A1 allosteric enhancer. *Bioorg Med Chem Lett* **16**:1402-1404.
- Bardo MT (1998) Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* **12**:37-67.
- Belcheva MM, Szucs M, Wang D, Sadee W and Coscia CJ (2001) mu-Opioid receptor-mediated ERK activation involves calmodulin-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* **276**:33847-33853.
- Beltramo M (2009) Cannabinoid type 2 receptor as a target for chronic - pain. *Mini Rev Med Chem* **9**:11-25.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A and Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**:1094-1097.

Ben-Shahar O, Keeley P, Cook M, Brake W, Joyce M, Nyffeler M, Heston R and Ettenberg A (2007) Changes in levels of D1, D2, or NMDA receptors during withdrawal from brief or extended daily access to IV cocaine. *Brain Res* **1131**:220-228.

Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA and Jeang KT (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* **272**:30603-30606.

Berke JD and Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**:515-532.

Berne RM, Knabb RM, Ely SW and Rubio R (1983) Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* **42**:3136-3142.

Berrendero F, Mendizabal V, Murtra P, Kieffer BL and Maldonado R (2003) Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [<sup>35</sup>S]-GTPgammaS binding in the brain of mu-, delta- and kappa-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* **18**:2197-2202.

Bertolino A, Fazio L, Di Giorgio A, Blasi G, Romano R, Taurisano P, Caforio G, Sinibaldi L, Ursini G, Popolizio T, Tirota E, Papp A, Dallapiccola B, Borrelli E and Sadee W (2009) Genetically determined interaction between the dopamine transporter and the D2 receptor on prefronto-striatal activity and volume in humans. *J Neurosci* **29**:1224-1234.

Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Herve D, Valjent E and Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* **28**:5671-5685.

Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, Newman AH, Javitch JA, Weinstein H, Gether U and Loland CJ (2008) The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* **11**:780-789.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V and Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* **163**:463-468.

Bjorness TE, Kelly CL, Gao T, Poffenberger V and Greene RW (2009) Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors. *J Neurosci* **29**:1267-1276.

Blum D, Galas MC, Pintor A, Brouillet E, Ledent C, Muller CE, Bantubungi K, Galluzzo M, Gall D, Cuvelier L, Rolland AS, Popoli P and Schiffmann SN (2003) A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. *J Neurosci* **23**:5361-5369.

- Bofill-Cardona E, Kudlacek O, Yang Q, Ahorn H, Freissmuth M and Nanoff C (2000) Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *J Biol Chem* **275**:32672-32680.
- Bohm SK, Grady EF and Bunnett NW (1997) Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* **322** ( Pt 1):1-18.
- Boudreau AC, Ferrario CR, Glucksman MJ and Wolf ME (2009) Signaling pathway adaptations and novel protein kinase A substrates related to behavioral sensitization to cocaine. *J Neurochem* **110**:363-377.
- Boulay F and Rabiet MJ (2005) The chemoattractant receptors FPR and C5aR: same functions--different fates. *Traffic* **6**:83-86.
- Bourne HR, Sanders DA 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.
- Bradberry CW (2000) Acute and chronic dopamine dynamics in a nonhuman primate model of recreational cocaine use. *J Neurosci* **20**:7109-7115.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V and Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* **60**:155-163.
- Bridges TM and Lindsley CW (2008) G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol* **3**:530-541.
- Brotchie JM (2003) CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease. *Curr Opin Pharmacol* **3**:54-61.
- Brown RM and Short JL (2008) Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. *J Pharm Pharmacol* **60**:1409-1430.
- Bruns RF, Lu GH and Pugsley TA (1986) Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* **29**:331-346.
- Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T and Onaivi ES (2008) Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci* **1139**:450-457.
- Bulenger S, Marullo S and Bouvier M (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* **26**:131-137.

- Bunemann M, Frank M and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:16077-16082.
- Burgueno J, Enrich C, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R and Ciruela F (2003) Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J Neurochem* **86**:785-791.
- Burnstock G (2009) Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* **15**:1717-1735.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK and Bergman J (1999) Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists in rats that self-administer cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:353-360.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A and Borrelli E (2002) Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *J Neurosci* **22**:2977-2988.
- Calabresi P, De Murtas M and Bernardi G (1997) The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence. *Neuroscience* **78**:39-60.
- Canals M, Angulo E, Casado V, Canela EI, Mallol J, Vinals F, Staines W, Tinner B, Hillion J, Agnati L, Fuxe K, Ferre S, Lluís C and Franco R (2005) Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J Neurochem* **92**:337-348.
- Canals M, Burgueno J, Marcellino D, Cabello N, Canela EI, Mallol J, Agnati L, Ferre S, Bouvier M, Fuxe K, Ciruela F, Lluís C and Franco R (2004) Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* **88**:726-734.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, Neve K, Fuxe K, Agnati LF, Woods AS, Ferre S, Lluís C, Bouvier M and Franco R (2003) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* **278**:46741-46749.
- Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL and Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* **282**:2272-2275.
- Carlisle HJ and Kennedy MB (2005) Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **28**:182-187.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M and Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:237-260.

Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, Cortes A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C and Franco R (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* **5**:727-733.

Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, Müller C, Woods AS, Hope BT, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Lluís C, Goldberg SR, Moratalla R, Franco R and Ferre S (2007) Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**:2249-2259.

Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R and Calabresi P (2003) Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* **23**:8506-8512.

Centonze D, Picconi B, Baunez C, Borrelli E, Pisani A, Bernardi G and Calabresi P (2002) Cocaine and amphetamine depress striatal GABAergic synaptic transmission through D2 dopamine receptors. *Neuropsychopharmacology* **26**:164-175.

Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, Goldberg SR, Bader M, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C, Franco R, Ferre S and Woods AS (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem* **76**:5354-5363.

Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortes A, Canela EI, Lopez-Gimenez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferre S and Franco R (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* **26**:2080-2087.

Civelli O, Bunzow JR and Grandy DK (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **33**:281-307.

Colpaert FC, Niemegeers CJ and Janssen PA (1978) Discriminative stimulus properties of cocaine and d-amphetamine, and antagonism by haloperidol: a comparative study. *Neuropharmacology* **17**:937-942.

Corrigall WA and Coen KM (1991) Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* **39**:799-802.

Costa T and Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:7321-7325.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA and Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**:83-87.

Cristalli G and Zimmermann H (2009) Third Joint Italian-German Purine Club Meeting: "Purinergic receptors: new frontiers for novel therapies". *Purinergic Signal*.

Cunha RA and Ribeiro JA (2000) Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* **39**:1156-1167.

Cvejic S and Devi LA (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* **272**:26959-26964.

Chausmer AL, Elmer GI, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK and Katz JL (2002) Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* **163**:54-61.

Chen JC, Chen PC and Chiang YC (2009) Molecular mechanisms of psychostimulant addiction. *Chang Gung Med J* **32**:148-154.

Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK and Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**:1258-1265.

Chevaleyre V and Castillo PE (2003) Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* **38**:461-472.

Chiang MC, Lee YC, Huang CL and Chern Y (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J Biol Chem* **280**:14331-14340.

Choi WJ, Lee HW, Kim HO, Chinn M, Gao ZG, Patel A, Jacobson KA, Moon HR, Jung YH and Jeong LS (2009) Design and synthesis of N(6)-substituted-4'-thioadenosine-5'-uronamides as potent and selective human A(3) adenosine receptor agonists. *Bioorg Med Chem* **17**:8003-8011.

Christie MJ and Vaughan CW (2001) Neurobiology Cannabinoids act backwards. *Nature* **410**:527-530.

Christopoulos A (2002) Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**:198-210.

Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP and Lodish HF (1994) Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:11728-11732.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG and Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**:685-688.

- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD and Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* **8**:4025-4034.
- Dalley JW and Everitt BJ (2009) Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. *Semin Cell Dev Biol* **20**:403-410.
- Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin JP and Baneres JL (2006) Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J* **25**:5693-5702.
- Davis RJ (1995) Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* **42**:459-467.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C and Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* **9**:53-58.
- De Vries TJ and Schoffeleer AN (2005) Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci* **26**:420-426.
- De Vries TJ, Schoffeleer AN, Binnekade R and Vanderschuren LJ (1999) Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* **143**:254-260.
- De Wit H and Wise RA (1977) Blockade of cocaine reinforcement in rats with the dopamine receptor blocker pimozide, but not with the noradrenergic blockers phentolamine or phenoxybenzamine. *Can J Psychol* **31**:195-203.
- Deary A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD and Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* **347**:72-76.
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD and Bunnett NW (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* **148**:1267-1281.
- Derkinderen P, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano JC, de Franciscis V, Gelman M and Girault JA (1996) Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* **273**:1719-1722.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J and Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* **23**:2371-2382.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS and Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* **34**:605-613.



- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A and Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**:1946-1949.
- Di Carlo G and Izzo AA (2003) Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* **12**:39-49.
- Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* **137**:75-114.
- Di Marzo V, Bifulco M and De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* **3**:771-784.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC and Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**:686-691.
- Dickinson SD, Sabeti J, Larson GA, Giardina K, Rubinstein M, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ, Gerhardt GA and Zahniser NR (1999) Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. *J Neurochem* **72**:148-156.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S and Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:10819-10824.
- Dohlman HG, Caron MG and Lefkowitz RJ (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26**:2657-2664.
- Dunwiddie TV and Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**:31-55.
- Egertova M, Cravatt BF and Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* **119**:481-496.
- El Beyrouthy M, Arnold N, Delelis-Dusollier A and Dupont F (2008) Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol* **120**:315-334.
- El Far O, Bofill-Cardona E, Airas JM, O'Connor V, Boehm S, Freissmuth M, Nanoff C and Betz H (2001) Mapping of calmodulin and Gbetagamma binding domains within the C-terminal region of the metabotropic glutamate receptor 7A. *J Biol Chem* **276**:30662-30669.
- Elmer GI, Pieper JO, Levy J, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK and Wise RA (2005) Brain stimulation and morphine reward deficits in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Psychopharmacology (Berl)* **182**:33-44.

- Elsworth JD and Roth RH (1997) Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **144**:4-9.
- Escriche M, Burgueno J, Ciruela F, Canela EI, Mallol J, Enrich C, Lluís C and Franco R (2003) Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling. *Exp Cell Res* **285**:72-90.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Takida S and Wedegaertner PB (2005) Loss of association between activated Galpha q and Gbetagamma disrupts receptor-dependent and receptor-independent signaling. *Cell Signal* **17**:1218-1228.
- Fasano S, D'Antoni A, Orban PC, Valjent E, Putignano E, Vara H, Pizzorusso T, Giustetto M, Yoon B, Soloway P, Maldonado R, Caboche J and Brambilla R (2009) Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biol Psychiatry* **66**:758-768.
- Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA and Bourne HR (1994) cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* **269**:7851-7854.
- Feoktistov I and Biaggioni I (1995) Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* **96**:1979-1986.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**:1-24.
- Ferrada C, Ferre S, Casado V, Cortes A, Justinova Z, Barnes C, Canela EI, Goldberg SR, Leurs R, Lluís C and Franco R (2008) Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. *Neuropharmacology* **55**:190-197.
- Ferrada C, Moreno E, Casado V, Bongers G, Cortes A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferre S, Lluís C and Franco R (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol* **157**:64-75.
- Ferre S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pflieger KD, Pin JP, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS and Franco R (2009a) Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* **5**:131-134.
- Ferre S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C and Franco R (2007) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* **30**:440-446.

- Ferre S, Fredholm BB, 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.
- Ferre S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, Casado V, Fuxe K, Goldberg SR, 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 U S A* **99**:11940-11945.
- Ferre S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F, Lluís C, Franco R, Azdad K and Schiffmann SN (2008) An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* **14**:1468-1474.
- Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB and Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7238-7241.
- Ferre S, Woods AS, Navarro G, Aymerich M, Lluís C and Franco R (2009b) Calcium-mediated modulation of the quaternary structure and function of adenosine A(2A)-dopamine D(2) receptor heteromers. *Curr Opin Pharmacol*.
- Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Przegalinski E, Muller CE, Agnati L, Franco R, Roberts DC and Fuxe K (2006) Involvement of adenosine A2A and dopamine receptors in the locomotor and sensitizing effects of cocaine. *Brain Res* **1077**:67-80.
- Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2004) A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci* **3**:628-638.
- Fioramonti J and Bueno L (2008) Role of cannabinoid receptors in the control of gastrointestinal motility and perception. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2**:385-397.
- Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB and Ruoho AE (2009) The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science* **323**:934-937.
- Fontinha BM, Delgado-Garcia JM, Madronal N, Ribeiro JA, Sebastiao AM and Gruart A (2009) Adenosine A(2A) receptor modulation of hippocampal CA3-CA1 synapse plasticity during associative learning in behaving mice. *Neuropsychopharmacology* **34**:1865-1874.
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2003) Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* **421**:127-128.

Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A and Palczewski K (2004) The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett* **564**:281-288.

Förster T (1948) *Ann Phys* **2**:57.

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

Franco R, Casado V, Ciruela F, Mallol J, Lluís C and Canela EI (1996) The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A1 adenosine receptors. *Biochemistry* **35**:3007-3015.

Franco R, Casado V, Cortes A, Mallol J, Ciruela F, Ferre S, Lluís C and Canela EI (2008a) G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S90-98.

Franco R, Casado V, Cortes A, Perez-Capote K, Mallol J, Canela E, Ferre S and Lluís C (2008b) Novel pharmacological targets based on receptor heteromers. *Brain Res Rev* **58**:475-482.

Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, Casado V, Lledo P, Zoli M, Lluís C and Fuxe K (2000) Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **23**:S50-59.

Franco R, Lluís C, Canela EI, Mallol J, Agnati L, Casado V, Ciruela F, Ferre S and Fuxe K (2007) Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *J Neural Transm* **114**:93-104.

Frank M, Thumer L, Lohse MJ and Bunemann M (2005) G Protein activation without subunit dissociation depends on a G $\alpha$ (i)-specific region. *J Biol Chem* **280**:24584-24590.

Fraser CM, Chung FZ, Wang CD and Venter JC (1988) Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:5478-5482.

Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P and Williams M (1994) Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* **46**:143-156.

Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G and Wasserman W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**:364-374.

Fredholm BB and Svenningsson P (2003) Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* **61**:S5-9.

- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schioth HB (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.
- Freissmuth M, Schutz W and Linder ME (1991) Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J Biol Chem* **266**:17778-17783.
- Fuxe K, Agnati LF, von Euler G, Tanganelli S, O'Connor WT, Ferre S, Hedlund P and Zoli M (1992) Neuropeptides, excitatory amino acid and adenosine A2 receptors regulate D2 receptors via intramembrane receptor-receptor interactions. Relevance for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurochem Int* **20 Suppl**:215S-224S.
- Fuxe K, Canals M, Torvinen M, Marcellino D, Terasmaa A, Genedani S, Leo G, Guidolin D, Diaz-Cabiale Z, Rivera A, Lundstrom L, Langel U, Narvaez J, Tanganelli S, Lluís C, Ferre S, Woods A, Franco R and Agnati LF (2007) Intramembrane receptor-receptor interactions: a novel principle in molecular medicine. *J Neural Transm* **114**:49-75.
- Gainetdinov RR and Caron MG (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**:261-284.
- Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE and Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**:177-184.
- Gandia J, Galino J, Amaral OB, Soriano A, Lluís C, Franco R and Ciruela F (2008a) Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett* **582**:2979-2984.
- Gandia J, Lluís C, Ferre S, Franco R and Ciruela F (2008b) Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays* **30**:82-89.
- Gehl C, Waadt R, Kudla J, Mendel RR and Hansch R (2009) New GATEWAY vectors for High Throughput Analyses of Protein-Protein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol Plant* **2**:1051-1058.
- George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY and O'Dowd BF (1998) A transmembrane domain-derived peptide inhibits D1 dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* **273**:30244-30248.
- George SR, O'Dowd BF and Lee SP (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**:808-820.
- Gerfen CR (2004) The Rat Nervous System (Paxinos G ed) pp 445-508, Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr. and Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**:1429-1432.

Gerwins P and Fredholm BB (1992) Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7330-7334.

Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**:90-113.

Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu XY and Kalivas PW (1999) Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment. *J Neurochem* **72**:157-165.

Gilchrist A (2007) Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics. *Trends Pharmacol Sci* **28**:431-437.

Gines S, Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canela EI, Mallol J, Lluís C and Franco R (2001) Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol Pharmacol* **59**:1314-1323.

Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferre S, Fuxe K and Franco R (2000) Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8606-8611.

Gingrich JA and Caron MG (1993) Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* **16**:299-321.

Girault JA, Valjent E, Caboche J and Herve D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* **7**:77-85.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM and Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**:606-612.

Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M and Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* **2**:358-363.

Goeders NE and Smith JE (1983) Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement. *Science* **221**:773-775.

Golan M, Schreiber G and Avissar S (2009) Antidepressants, beta-arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions. *Curr Pharm Des* **15**:1699-1708.

- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V and Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**:RC110.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A and Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* **1071**:10-23.
- Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ and Sealfon SC (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* **452**:93-97.
- Goudet C, Kniazeff J, Hlavackova V, Malhaire F, Maurel D, Acher F, Blahos J, Prezeau L and Pin JP (2005) Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators. *J Biol Chem* **280**:24380-24385.
- Gouldson PR, Higgs C, Smith RE, Dean MK, Gkoutos GV and Reynolds CA (2000) Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* **23**:S60-77.
- Gracia E, Cortes A, Meana JJ, Garcia-Sevilla J, Herhsfield MS, Canela EI, Mallol J, Lluís C, Franco R and Casado V (2008) Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [H](R)-pia binding to the caudate nucleus. *J Neurochem* **107**:161-170.
- Greengard P (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* **294**:1024-1030.
- Gudermann T, Schoneberg T and Schultz G (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* **20**:399-427.
- Hajos N, Ledent C and Freund TF (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* **106**:1-4.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I and Mechoulam R (2001) 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3662-3665.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG and Lefkowitz RJ (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**:12657-12665.
- Hauser RA, Hubble JP and Truong DD (2003) Randomized trial of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline in advanced PD. *Neurology* **61**:297-303.

Hayashi T and Su T (2005) The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol* **3**:267-280.

Hayashi T and Su TP (2001) Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:491-496.

Hayashi T and Su TP (2003a) Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:726-733.

Hayashi T and Su TP (2003b) Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:718-725.

Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C and Bouvier M (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* **271**:16384-16392.

Heikkila RE, Cabbat FS and Duvoisin RC (1979) Motor activity and rotational behavior after analogs of cocaine: correlation with dopamine uptake blockade. *Commun Psychopharmacol* **3**:285-290.

Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Aswad DW and Greengard P (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. II. Purification and characterization of the phosphoprotein from bovine caudate nucleus. *J Neurosci* **4**:99-110.

Herkenham M, Groen BG, Lynn AB, De Costa BR and Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain Res* **552**:301-310.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR and Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1932-1936.

Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M and Maloteaux JM (1997) Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int* **31**:291-299.

Heroux M, Hogue M, Lemieux S and Bouvier M (2007) Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J Biol Chem* **282**:31610-31620.

Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C and Franco R (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* **59**:127-134.



- Herrick-Davis K, Grinde E and Mazurkiewicz JE (2004) Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* **43**:13963-13971.
- Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E and Mazurkiewicz JE (2006) Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **281**:27109-27116.
- Hiley CR (2009) Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **53**:267-276.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A and Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* **69**:631-638.
- Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, Canela EI, Zoli M, Agnati LF, Ibanez CF, Lluís C, Franco R, Ferre 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.
- Hirschberg BT and Schimerlik MI (1994) A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine m<sub>2</sub> muscarinic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **269**:26127-26135.
- Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, Trojanova J, Prezeau L, Pin JP and Blahos J (2005) Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR. *EMBO J* **24**:499-509.
- Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR and Herkenham M (1990) The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci* **13**:420-423.
- Hu CD, Chinenov Y and Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**:789-798.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM and Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR<sub>1</sub> receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:8400-8405.
- Iversen L and Chapman V (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol* **2**:50-55.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP and Stevens RC (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A<sub>2A</sub> adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **322**:1211-1217.

- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M and Seuwen K (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **1**:761-782.
- Jarrahian A, Watts VJ and Barker EL (2004) D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:880-886.
- Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB and Chen JF (2009) Adenosine, adenosine A<sub>2A</sub> antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **15**:406-413.
- Jenner TL and Rose'meyer RB (2006) Adenosine A<sub>3</sub> receptor mediated coronary vasodilation in the rat heart: changes that occur with maturation. *Mech Ageing Dev* **127**:264-273.
- Jockers R, Angers S, Da Silva A, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M and Marullo S (1999) Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* **274**:28900-28908.
- Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V and Graybiel AM (1999) Building neural representations of habits. *Science* **286**:1745-1749.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E and Fredholm BB (2001) Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:9407-9412.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA and Gerald C (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**:674-679.
- Jordan BA and Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**:697-700.
- Kalivas PW (2004) Choose to study choice in addiction. *Am J Psychiatry* **161**:193-194.
- Kalivas PW and Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* **162**:1403-1413.
- Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K and Nakata H (2003) Oligomerization of adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* **306**:544-549.
- Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y and Jenner P (1998) Adenosine A<sub>2A</sub> antagonist: a novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Ann Neurol* **43**:507-513.

- Kanda T, Jackson MJ, Smith LA, Pearce RK, Nakamura J, Kase H, Kuwana Y and Jenner P (2000) Combined use of the adenosine A<sub>2A</sub> antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol* **162**:321-327.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A and Bettler B (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**:683-687.
- Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K and Glass M (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* **67**:1697-1704.
- Kelly E, Bailey CP and Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S379-388.
- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK and Low MJ (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neurosci* **18**:3470-3479.
- Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol* **85**:431-470.
- Kiesman WF, Elzein E and Zablocki J (2009) A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Handb Exp Pharmacol*:25-58.
- Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ and Lee JH (2008) Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol* **154**:1125-1134.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L and Friedman H (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* **74**:486-496.
- Klotz KN and Lohse MJ (1986) The glycoprotein nature of A1 adenosine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **140**:406-413.
- Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA and Kornetsky C (2001) Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **68**:797-803.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF and Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that G<sub>i</sub>-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:12706-12710.

- Koeltzow TE, Xu M, Cooper DC, Hu XT, Tonegawa S, Wolf ME and White FJ (1998) Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. *J Neurosci* **18**:2231-2238.
- Kofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA and Sperlagh B (2005) Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* **25**:2874-2884.
- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* **2**:1-7.
- Kong MM, Fan T, Varghese G, O'Dowd B F and George SR (2006) Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. *Mol Pharmacol* **70**:78-89.
- Kong MM, Hasbi A, Mattocks M, Fan T, O'Dowd BF and George SR (2007) Regulation of D1 dopamine receptor trafficking and signaling by caveolin-1. *Mol Pharmacol* **72**:1157-1170.
- Konradi C (1998) The molecular basis of dopamine and glutamate interactions in the striatum. *Adv Pharmacol* **42**:729-733.
- Koob GF (1992) Neurobiological mechanisms in cocaine and opiate dependence. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* **70**:79-92.
- Koob GF (1996) Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry* **1**:186-189.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* **272**:5-8.
- Kull B, Ferre S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C and Fredholm BB (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.
- Lastres-Becker I, De Miguel R and Fernandez-Ruiz JJ (2003) The endocannabinoid system and Huntington's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2**:335-347.
- Laurier LG, Corrigall WA and George SR (1994) Dopamine receptor density, sensitivity and mRNA levels are altered following self-administration of cocaine in the rat. *Brain Res* **634**:31-40.
- Lawrence DK and Gill EW (1975) The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol* **11**:595-602.

- Le Foll B, Diaz J and Sokoloff P (2005) A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. *Neuroreport* **16**:175-178.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W and Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**:401-404.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF and George SR (2004) Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* **279**:35671-35678.
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* **273**:18677-18680.
- Limbird LE, Meyts PD and Lefkowitz RJ (1975) Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun* **64**:1160-1168.
- Little KY, Kirkman JA, Carroll FI, Breese GR and Duncan GE (1993) [<sup>125</sup>I]RTI-55 binding to cocaine-sensitive dopaminergic and serotonergic uptake sites in the human brain. *J Neurochem* **61**:1996-2006.
- Liu XY, Chu XP, Mao LM, Wang M, Lan HX, Li MH, Zhang GC, Parelkar NK, Fibuch EE, Haines M, Neve KA, Liu F, Xiong ZG and Wang JQ (2006) Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. *Neuron* **52**:897-909.
- Liu Y, Buck DC, Macey TA, Lan H and Neve KA (2007) Evidence that calmodulin binding to the dopamine D2 receptor enhances receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* **27**:47-65.
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG and Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* **265**:3202-3211.
- Londos C, Cooper DM and Wolff J (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2551-2554.
- Longordo F, Kopp C and Luthi A (2009) Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *Eur J Neurosci* **29**:1810-1819.
- Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT and Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* **29**:695-703.
- Lucas JL, Wang D and Sadee W (2006) Calmodulin binding to peptides derived from the i3 loop of muscarinic receptors. *Pharm Res* **23**:647-653.

Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655-661.

Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **115**:455-465.

MacDonald RL, Skerritt JH and Werz MA (1986) Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J Physiol* **370**:75-90.

Maggio R, Scarselli M, Novi F, Millan MJ and Corsini GU (2003) Potent activation of dopamine D3/D2 heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. *J Neurochem* **87**:631-641.

Maggio R, Vogel Z and Wess J (1993) Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:3103-3107.

Maia L and de Mendonca A (2002) Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* **9**:377-382.

Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J and Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**:657-659.

Maldonado R and Rodriguez de Fonseca F (2002) Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci* **22**:3326-3331.

Manzoni O, Pujalte D, Williams J and Bockaert J (1998) Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal. *J Neurosci* **18**:7996-8002.

Marcellino D, Ferre S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluís C, Fuxe K and Franco R (2008) Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* **283**:26016-26025.

Marcellino D, Roberts DC, Navarro G, Filip M, Agnati L, Lluís C, Franco R and Fuxe K (2007) Increase in A2A receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal. *Brain Res* **1143**:208-220.

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

Marinissen MJ and Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**:368-376.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE and Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**:517-532.

Martinez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Frankle WG, Cooper T, Kleber HD, Fischman MW and Laruelle M (2004) Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **29**:1190-1202.

Martinez D, Slifstein M, Narendran R, Foltin RW, Broft A, Hwang DR, Perez A, Abi-Dargham A, Fischman MW, Kleber HD and Laruelle M (2009) Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology* **34**:1774-1782.

Martinez Munoz L, Lucas P, Navarro G, Checa AI, Franco R, Martinez AC, Rodriguez-Frade JM and Mellado M (2009) Dynamic regulation of CXCR1 and CXCR2 homo- and heterodimers. *J Immunol* **183**:7337-7346.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC and Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**:561-564.

Matsukawa N, Maki M, Yasuhara T, Hara K, Yu G, Xu L, Kim KM, Morgan JC, Sethi KD and Borlongan CV (2007) Overexpression of D2/D3 receptors increases efficacy of ropinirole in chronically 6-OHDA-lesioned Parkinsonian rats. *Brain Res* **1160**:113-123.

Matsumoto RR, Gilmore DL, Pouw B, Bowen WD, Williams W, Kausar A and Coop A (2004) Novel analogs of the sigma receptor ligand BD1008 attenuate cocaine-induced toxicity in mice. *Eur J Pharmacol* **492**:21-26.

Matsumoto RR, Hewett KL, Pouw B, Bowen WD, Husbands SM, Cao JJ and Hauck Newman A (2001) Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology* **41**:878-886.

Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW and Brackett DJ (2003) Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* **469**:1-12.

Matsumoto RR, McCracken KA, Pouw B, Zhang Y and Bowen WD (2002) Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* **42**:1043-1055.

Matsumoto RR, Pouw B, Mack AL, Daniels A and Coop A (2007) Effects of UMB24 and (+/-)-SM 21, putative sigma2-preferring antagonists, on behavioral toxic and stimulant effects of cocaine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **86**:86-91.

- Mattera R, Pitts BJ, Entman ML and Birnbaumer L (1985) Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting. *J Biol Chem* **260**:7410-7421.
- Mattson BJ, Bossert JM, Simmons DE, Nozaki N, Nagarkar D, Kreuter JD and Hope BT (2005) Cocaine-induced CREB phosphorylation in nucleus accumbens of cocaine-sensitized rats is enabled by enhanced activation of extracellular signal-related kinase, but not protein kinase A. *J Neurochem* **95**:1481-1494.
- May LT, Leach K, Sexton PM and Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:1-51.
- Mazzola C, Micale V and Drago F (2003) Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol* **477**:219-225.
- McAllister SD and Glass M (2002) CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**:161-171.
- McVey M, Ramsay D, Kellett E, Rees S, Wilson S, Pope AJ and Milligan G (2001) Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* **276**:14092-14099.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR and et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **50**:83-90.
- Meiergerd SM, Patterson TA and Schenk JO (1993) D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J Neurochem* **61**:764-767.
- Menkel M, Terry P, Pontecorvo M, Katz JL and Witkin JM (1991) Selective sigma ligands block stimulant effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* **201**:251-252.
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A and Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **277**:44925-44931.
- Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G and Borrelli E (1997) Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* **79**:323-327.



- Mesangeau C, Narayanan S, Green AM, Shaikh J, Kaushal N, Viard E, Xu YT, Fishback JA, Poupaert JH, Matsumoto RR and McCurdy CR (2008) Conversion of a highly selective sigma-1 receptor-ligand to sigma-2 receptor preferring ligands with anticocaine activity. *J Med Chem* **51**:1482-1486.
- Meschler JP, Clarkson FA, Mathews PJ, Howlett AC and Madras BK (2000) D(2), but not D(1) dopamine receptor agonists potentiate cannabinoid-induced sedation in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* **292**:952-959.
- Meschler JP and Howlett AC (2001) Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* **40**:918-926.
- Miczek KA and Yoshimura H (1982) Disruption of primate social behavior by d-amphetamine and cocaine: differential antagonism by antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* **76**:163-171.
- Michnick SW (2001) Exploring protein interactions by interaction-induced folding of proteins from complementary peptide fragments. *Curr Opin Struct Biol* **11**:472-477.
- Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S46-55.
- Milligan G, Murdoch H, Kellett E, White JH and Feng GJ (2004) Interactions between G-protein-coupled receptors and periplakin: a selective means to regulate G-protein activation. *Biochem Soc Trans* **32**:878-880.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**:189-225.
- Monassier L and Bousquet P (2002) Sigma receptors: from discovery to highlights of their implications in the cardiovascular system. *Fundam Clin Pharmacol* **16**:1-8.
- Moore KE and Gudelsky GA (1977) Drug actions on dopamine turnover in the median eminence. *Adv Biochem Psychopharmacol* **16**:227-235.
- Moore RJ, Vinsant SL, Nader MA, Porrino LJ and Friedman DP (1998) Effect of cocaine self-administration on dopamine D2 receptors in rhesus monkeys. *Synapse* **30**:88-96.
- Moreau JL and Huber G (1999) Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* **31**:65-82.
- Morgan D, Brebner K, Lynch WJ and Roberts DC (2002a) Increases in the reinforcing efficacy of cocaine after particular histories of reinforcement. *Behav Pharmacol* **13**:389-396.
- Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O, Nader SH, Buchheimer N, Ehrenkauf RL and Nader MA (2002b) Social dominance in

- monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nat Neurosci* **5**:169-174.
- Morgan D and Roberts DC (2004) Sensitization to the reinforcing effects of cocaine following binge-abstinent self-administration. *Neurosci Biobehav Rev* **27**:803-812.
- Mortensen OV and Amara SG (2003) Dynamic regulation of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* **479**:159-170.
- Munro S, Thomas KL and Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**:61-65.
- Munshi R, Pang IH, Sternweis PC and Linden J (1991) A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* **266**:22285-22289.
- Nader MA, Daunais JB, Moore T, Nader SH, Moore RJ, Smith HR, Friedman DP and Porrino LJ (2002) Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology* **27**:35-46.
- Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H and Oyanagi K (2005) Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* **26**:233-238.
- Narasimhaiah R, Kamens HM and Picciotto MR (2009) Effects of galanin on cocaine-mediated conditioned place preference and ERK signaling in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **204**:95-102.
- Navarro G, Aymerich MS, Marcellino D, Cortes A, Casado V, Mallol J, Canela EI, Agnati L, Woods AS, Fuxe K, Lluís C, Lanciego JL, Ferré S and Franco R (2009) Interactions between calmodulin, adenosine A2A, and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* **284**:28058-28068.
- Nayak PK, Misra AL and Mule SJ (1976) Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* **196**:556-569.
- Neisewander JL, Fuchs RA, Tran-Nguyen LT, Weber SM, Coffey GP and Joyce JN (2004) Increases in dopamine D3 receptor binding in rats receiving a cocaine challenge at various time points after cocaine self-administration: implications for cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **29**:1479-1487.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**:119-128.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T and Christopoulos A (2003) International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**:597-606.

- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M and O'Dowd BF (1994) Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* **267**:7-19.
- Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P and George SR (1996) Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **227**:200-204.
- Nie J and Lewis DL (2001) Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J Neurosci* **21**:8758-8764.
- Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM and Romero J (2004) Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* **53**:208-213.
- Nutt JG (1990) Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology* **40**:340-345.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C and Rodriguez M (2008) Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* **23 Suppl 3**:S548-559.
- Oka S, Tsuchie A, Tokumura A, Muramatsu M, Suhara Y, Takayama H, Waku K and Sugiura T (2003) Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species. *J Neurochem* **85**:1374-1381.
- Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T and Ueda N (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* **279**:5298-5305.
- Ostrom RS and Insel PA (2004) The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* **143**:235-245.
- Packard MG and Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* **25**:563-593.
- Pak Y, O'Dowd BF, Wang JB and George SR (1999) Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**:27610-27616.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745.

Palmer TM, Gettys TW, Jacobson KA and Stiles GL (1994) Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes. *Mol Pharmacol* **45**:1082-1094.

Palmer TM, Gettys TW and Stiles GL (1995) Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor. *J Biol Chem* **270**:16895-16902.

Park B, McPartland JM and Glass M (2004) Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**:189-197.

Park PS, Lodowski DT and Palczewski K (2008) Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:107-141.

Paulmurugan R and Gambhir SS (2003) Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal Chem* **75**:1584-1589.

Peleg S, Varon D, Ivanina T, Dessauer CW and Dascal N (2002) G(alpha)(i) controls the gating of the G protein-activated K(+) channel, GIRK. *Neuron* **33**:87-99.

Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**:129-180.

Pfleger KD, Dromey JR, Dalrymple MB, Lim EM, Thomas WG and Eidne KA (2006) Extended bioluminescence resonance energy transfer (eBRET) for monitoring prolonged protein-protein interactions in live cells. *Cell Signal* **18**:1664-1670.

Pfleger KD and Eidne KA (2005) Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* **385**:625-637.

Phillis JW, Edstrom JP, Kostopoulos GK and Kirkpatrick JR (1979) Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* **57**:1289-1312.

Picciotto MR (1998) Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend* **51**:165-172.

Pich EM, Pagliusi SR, Tessari M, Talabot-Ayer D, Hooft van Huijsduijnen R and Chiamulera C (1997) Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science* **275**:83-86.

Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA and Shine J (1992) Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:86-93.

Pierce KL and Lefkowitz RJ (2001) Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**:727-733.

- Pin JP, Galvez T and Prezeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **98**:325-354.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* **4**:873-884.
- Popoli P, Blum D, Domenici MR, Burnouf S and Chern Y (2008) A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des* **14**:1500-1511.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB and Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **301**:1020-1024.
- Prinster SC, Hague C and Hall RA (2005) Heterodimerization of G protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* **57**:289-298.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J and Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**:1-20.
- Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA and Stiles GL (1991) Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol Pharmacol* **40**:639-647.
- Randall MD, Harris D, Kendall DA and Ralevic V (2002) Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* **95**:191-202.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF and George SR (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:654-659.
- Ravna AW, Sylte I and Dahl SG (2009) Structure and localisation of drug binding sites on neurotransmitter transporters. *J Mol Model* **15**:1155-1164.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS and Garnovskaya MN (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* **92**:179-212.
- Reeves S, Brown R, Howard R and Grasby P (2009) Increased striatal dopamine (D2/D3) receptor availability and delusions in Alzheimer disease. *Neurology* **72**:528-534.
- Reggio R, Pezzola A and Popoli P (1999) The intrastratial injection of an adenosine A(2) receptor antagonist prevents frontal cortex EEG abnormalities in a rat model of Huntington's disease. *Brain Res* **831**:315-318.

- Ribeiro JA, Sebastiao AM and de Mendonca A (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* **68**:377-392.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM and de Mendonca A (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect* **16**:80-86.
- Risinger FO, Freeman PA, Rubinstein M, Low MJ and Grandy DK (2000) Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **152**:343-350.
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR and Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**:1219-1223.
- Rivkees SA, Barbhaiya H and AP IJ (1999) Identification of the adenine binding site of the human A1 adenosine receptor. *J Biol Chem* **274**:3617-3621.
- Rivkees SA, Price SL and Zhou FC (1995) Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res* **677**:193-203.
- Robbins MJ, Ciruela F, Rhodes A and McIlhinney RA (1999) Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J Neurochem* **72**:2539-2547.
- Robbins TW and Everitt BJ (1999) Drug addiction: bad habits add up. *Nature* **398**:567-570.
- Robbins TW and Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* **78**:625-636.
- Roberts DC, Corcoran ME and Fibiger HC (1977) On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* **6**:615-620.
- Robinson TE, Gorny G, Mitton E and Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* **39**:257-266.
- Robinson TE and Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* **11**:1598-1604.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC and Patel YC (2000a) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288**:154-157.

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC and Patel YC (2000b) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **275**:7862-7869.

Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, Goldberg MP and O'Malley KL (2001) Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* **59**:46-53.

Romano C, Yang WL and O'Malley KL (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* **271**:28612-28616.

Romero J, Garcia L, Cebeira M, Zadrozny D, Fernandez-Ruiz JJ and Ramos JA (1995) The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci* **56**:2033-2040.

Romieu P, Martin-Fardon R and Maurice T (2000) Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroreport* **11**:2885-2888.

Romieu P, Phan VL, Martin-Fardon R and Maurice T (2002) Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade. *Neuropsychopharmacology* **26**:444-455.

Rosenbaum DM, Rasmussen SG and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**:356-363.

Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG and Linden J (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* **401**:163-186

Ross SB and Renyi AL (1967) Inhibition of the uptake of tritiated catecholamines by antidepressant and related agents. *Eur J Pharmacol* **2**:181-186.

Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV and Borrelli E (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* **22**:3293-3301.

Sagredo O, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J, Rodriguez ML and de Miguel R (2006) Chronic Delta9-tetrahydrocannabinol administration affects serotonin levels in the rat frontal cortex. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **372**:313-317.

Sakmar TP (1998) Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **59**:1-34.

Sanchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S and Guzman M

- (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* **61**:5784-5789.
- Santini E, Valjent E and Fisone G (2008) Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J* **275**:1392-1399.
- Saura C, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Mallol J, Lluís C and Franco R (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J Neurochem* **66**:1675-1682.
- Saura CA, Mallol J, Canela EI, Lluís C and Franco R (1998) Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem* **273**:17610-17617.
- Scarselli M, Armogida M, Chiacchio S, DeMontis MG, Colzi A, Corsini GU 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.
- Schapira AH, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Feger B, Hengerer B, Hirsch E, Jenner P, Le Novère N, Obeso JA, Schwarzschild MA, Spampinato U and Davidai G (2006) Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**:845-854.
- Scheerer P, Park JH, Hildebrand PW, Kim YJ, Krauss N, Choe HW, Hofmann KP and Ernst OP (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* **455**:497-502.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA and Ferre S (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* **83**:277-292.
- Schiffmann SN, Jacobs O and Vanderhaeghen JJ (1991) Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J Neurochem* **57**:1062-1067.
- Schulte G and Fredholm BB (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **15**:813-827.
- Schulz A, Grosse R, Schultz G, Gudermann T and Schöneberg T (2000) Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J Biol Chem* **275**:2381-2389.
- Schumann J and Yaka R (2009) Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **29**:6955-6963.
- Schwarzschild MA, Chen JF and Ascherio A (2002) Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. *Neurology* **58**:1154-1160.



- Sebastiao AM, de Mendonca A, Moreira T and Ribeiro JA (2001) Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation. *J Neurosci* **21**:8564-8571.
- Seeman P and Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **15**:264-270.
- Segal DM, Moraes CT and Mash DC (1997) Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA in the nucleus accumbens of human cocaine fatalities. *Brain Res Mol Brain Res* **45**:335-339.
- Segawa M (2003) Neurophysiology of Tourette's syndrome: pathophysiological considerations. *Brain Dev* **25 Suppl 1**:S62-69.
- Seidel MG, Klinger M, Freissmuth M and Holler C (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**:25833-25841.
- Seifert R and Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **366**:381-416.
- Senogles SE, Heimert TL, Odife ER and Quasney MW (2004) A region of the third intracellular loop of the short form of the D2 dopamine receptor dictates Gi coupling specificity. *J Biol Chem* **279**:1601-1606.
- Sharkey J, Glen KA, Wolfe S and Kuhar MJ (1988) Cocaine binding at sigma receptors. *Eur J Pharmacol* **149**:171-174.
- Sheng M and Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* **76**:823-847.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D and Ferrara P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* **270**:3726-3731.
- Soria G, Castane A, Berrendero F, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R and Valverde O (2004) Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci* **20**:2203-2213.
- Sotnikova TD, Beaulieu JM, Gainetdinov RR and Caron MG (2006) Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**:45-56.
- Spano PF, Govoni S and Trabucchi M (1978) Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* **19**:155-165.

- Staley JK and Mash DC (1996) Adaptive increase in D3 dopamine receptors in the brain reward circuits of human cocaine fatalities. *J Neurosci* **16**:6100-6106.
- Steeves TD and Fox SH (2008) Neurobiological basis of serotonin-dopamine antagonists in the treatment of Gilles de la Tourette syndrome. *Prog Brain Res* **172**:495-513.
- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD and Reppert SM (1992) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* **6**:384-393.
- Stella N, Schweitzer P and Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**:773-778.
- Stiles GL (1986) Photoaffinity cross-linked A1 adenosine receptor-binding subunits. Homologous glycoprotein expression by different tissues. *J Biol Chem* **261**:10839-10843.
- Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**:819-846.
- Su TP and Hayashi T (2001) Cocaine affects the dynamics of cytoskeletal proteins via sigma(1) receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**:456-458.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A and Waku K (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:58-64.
- Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G and Fredholm BB (1999) Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* **59**:355-396.
- Svenningsson P, Lindskog M, Ledent C, Parmentier M, Greengard P, Fredholm BB and Fisone G (2000) Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1856-1860.
- Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W and Starke K (1998) Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* **85**:395-403.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* **5**:30-34.
- Toda S, Shen HW, Peters J, Cagle S and Kalivas PW (2006) Cocaine increases actin cycling: effects in the reinstatement model of drug seeking. *J Neurosci* **26**:1579-1587.

- Torvinen M, Marcellino D, Canals M, Agnati LF, Lluís C, Franco R and Fuxe K (2005) Adenosine A<sub>2A</sub> receptor and dopamine D<sub>3</sub> receptor interactions: evidence of functional A<sub>2A</sub>/D<sub>3</sub> heteromeric complexes. *Mol Pharmacol* **67**:400-407.
- Tran-Nguyen LT, Fuchs RA, Coffey GP, Baker DA, O'Dell LE and Neisewander JL (1998) Time-dependent changes in cocaine-seeking behavior and extracellular dopamine levels in the amygdala during cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **19**:48-59.
- Trejo J, Hammes SR and Coughlin SR (1998) Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13698-13702.
- Trussell LO and Jackson MB (1985) Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:4857-4861.
- Turner JH, Gelasco AK and Raymond JR (2004) Calmodulin interacts with the third intracellular loop of the serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor at two distinct sites: putative role in receptor phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem* **279**:17027-17037.
- Ujike H, Kuroda S and Otsuki S (1996) sigma Receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine. *Eur J Pharmacol* **296**:123-128.
- Ulrich CD, 2nd, Holtmann M and Miller LJ (1998) Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* **114**:382-397.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV and Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Nature* **408**:199-203.
- Valjent E, Bertran-Gonzalez J, Aubier B, Greengard P, Herve D and Girault JA (2009) Mechanisms of Locomotor Sensitization to Drugs of Abuse in a Two-Injection Protocol. *Neuropsychopharmacology*.
- Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D and Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:491-496.
- Vallone D, Picetti R and Borrelli E (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* **24**:125-132.
- van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL and Moolenaar WH (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1257-1261.

- van der Stelt M and Di Marzo V (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* **480**:133-150.
- Vanderschuren LJ, Di Ciano P and Everitt BJ (2005) Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci* **25**:8665-8670.
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE and Gaitanaris GA (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4903-4908.
- Vetter SW and Leclerc E (2003) Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur J Biochem* **270**:404-414.
- Villardaga JP, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z and Lohse MJ (2008) Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* **4**:126-131.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL and Wolf AP (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* **14**:169-177.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Telang F, Logan J, Jayne M, Ma Y, Pradhan K, Wong C and Swanson JM (2009) Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. *Neuroimage*.
- Volkow ND and Swanson JM (2003) Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry* **160**:1909-1918.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Fischman M, Foltin R, Abumrad NN, Gatley SJ, Logan J, Wong C, Gifford A, Ding YS, Hitzemann R and Pappas N (1999) Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain. *Life Sci* **65**:PL7-12.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Chen AD, Dewey SL and Pappas N (1997) Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature* **386**:830-833.
- Vorel SR, Ashby CR, Jr., Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ, Middlemiss DN, Stemp G and Gardner EL (2002) Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci* **22**:9595-9603.
- Vortherms TA and Watts VJ (2004) Sensitization of neuronal A2A adenosine receptors after persistent D2 dopamine receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* **308**:221-227.
- Walaas SI and Greengard P (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-

innervated brain regions. I. Regional and cellular distribution in the rat brain. *J Neurosci* **4**:84-98.

Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K and Sanudo-Pena MC (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12198-12203.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K and Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* **23**:1398-1405.

Wang D, Sadee W and Quillan JM (1999) Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. *J Biol Chem* **274**:22081-22088.

Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP and Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* **20**:8305-8314.

Wardas J (2008) Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci* **13**:4071-4096.

Weerts EM and Griffiths RR (2003) The adenosine receptor antagonist CGS15943 reinstates cocaine-seeking behavior and maintains self-administration in baboons. *Psychopharmacology (Berl)* **168**:155-163.

Weis WI and Kobilka BK (2008) Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Struct Biol* **18**:734-740.

Welter M, Vallone D, Samad TA, Meziane H, Usiello A and Borrelli E (2007) Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:6840-6845.

Wenger T and Moldrich G (2002) The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**:301-307.

White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM and Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**:679-682.

Wong DF, Kuwabara H, Schretlen DJ, Bonson KR, Zhou Y, Nandi A, Brasic JR, Kimes AS, Maris MA, Kumar A, Contoreggi C, Links J, Ernst M, Rousset O, Zukin S, Grace AA, Lee JS, Rohde C, Jasinski DR, Gjedde A and London ED (2006) Increased occupancy of dopamine receptors in human striatum during cue-elicited cocaine craving. *Neuropsychopharmacology* **31**:2716-2727.

Woods AS (2004) The mighty arginine, the stable quaternary amines, the powerful aromatics, and the aggressive phosphate: their role in the noncovalent minuet. *J Proteome Res* **3**:478-484.

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

- Woods AS and Huestis MA (2001) A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* **12**:88-96.
- Woods AS, Marcellino D, Jackson SN, Franco R, Ferre S, Agnati LF and Fuxe K (2008) How calmodulin interacts with the adenosine A(2A) and the dopamine D(2) receptors. *J Proteome Res* **7**:3428-3434.
- Wreggett KA and Wells JW (1995) Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J Biol Chem* **270**:22488-22499.
- Wu DF, Yang LQ, Goschke A, Stumm R, Brandenburg LO, Liang YJ, Holtt V and Koch T (2008) Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J Neurochem* **104**:1132-1143.
- Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ and Tonegawa S (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* **79**:945-955.
- Yao L, Fan P, Jiang Z, Mailliard WS, Gordon AS and Diamond I (2003) Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14379-14384.
- Yin HH and Lovinger DM (2006) Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:8251-8256.
- Yuferov V, Zhou Y, Spangler R, Maggos CE, Ho A and Kreek MJ (1999) Acute "binge" cocaine increases mu-opioid receptor mRNA levels in areas of the rat mesolimbic mesocortical dopamine system. *Brain Res Bull* **48**:109-112.
- Zack M and Poulos CX (2009) Parallel roles for dopamine in pathological gambling and psychostimulant addiction. *Curr Drug Abuse Rev* **2**:11-25.
- Zhang R, Dzhura I, Grueter CE, Thiel W, Colbran RJ and Anderson ME (2005) A dynamic alpha-beta inter-subunit agonist signaling complex is a novel feedback mechanism for regulating L-type Ca<sup>2+</sup> channel opening. *FASEB J* **19**:1573-1575.
- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL and Civelli O (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:7432-7436.
- Zhu X and Wess J (1998) Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* **37**:15773-15784.
- Zink CF, Pagnoni G, Martin ME, Dhamala M and Berns GS (2003) Human striatal response to salient nonrewarding stimuli. *J Neurosci* **23**:8092-8097.