



Homòmers i heteròmers dels receptors D_2 de dopamina: implicacions funcionals a l'estriat

Jordi Bonaventura Morera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

HOMÒMERS I HETERÒMERS DELS RECEPTORS D₂ DE DOPAMINA: IMPLICACIONS FUNCIONALS A L'ESTRIAT.

Memòria presentada pel Llicenciat en Química i en Bioquímica

JORDI BONAVENTURA MORERA

per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi s'ha adscrit al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, dins el programa de doctorat de Biologia Cel·lular i Molecular, bienni 2006-2008.

El treball experimental i la redacció de la present memòria han estat realitzats per Jordi Bonaventura sota la direcció de la Dra. Carme Lluís Biset i el Dr. Rafael Franco Fernández.

Dra. Carme Lluís Biset

Dr. Rafael Franco Fernández

Jordi Bonaventura

Barcelona, juliol del 2012.

El fet de redactar aquesta Tesi és com fer un repàs de tot el temps que he passat al grup i és impossible destriar resultats i experiments de la resta d'experiències viscudes tan dins com fora del laboratori. M'agradaria pensar que no és necessari i que ells ja saben com d'importants han estat, malauradament, suposo que coincidiran amb mi en dir que les demostracions pel·liculeres d'afecte i agraïment mai han estat el meu fort. És per això, que no puc deixar d'escriure unes quantes línies més per deixar constància de la gent sense la qual tot aquest treball hauria estat impossible.

Tot i que ara que em poso a escriure-ho no tinc massa clar com acabarà sí que tinc molt clar com ha de començar. I és que en primer lloc no hi pot anar ningú més que els meus pares. He d'agraïr-los la paciència i el suport incondicional des del principi. El fet de mai posar objeccions al què he volgut fer, i m'atreviria a dir que viure-ho amb orgull. Em temo que ells han estat els que més han patit les conseqüències dels dies dolents i han gaudit menys dels dies bons. Gràcies per intentar entendre'm, encara que no us ho hagi posat fàcil.

Vaig entrar al grup fa uns anys, fa molts anys, quan tot just acabava la llicenciatura de bioquímica i encara recordo la primera conversa amb el Rafa i després amb la Carme. Recordo la passió amb que la Carme em va explicar el que feien i com va parlar-me de la gent del laboratori i en aquell moment vaig saber que no m'equivocava en demanar la beca. Espero no perdre mai la il·lusió i seguir vivint la ciència amb la intensitat amb que m'han ensenyat a fer-ho. A més, sempre més dubtaré de si *"s'han intercanviat o no els tubs"*. Tot i que a vegades (a vegades?) ha estat un martiri perseguir-lo, si em preguntessin de qui he après més durant aquests anys (tant d'aspectes tècnics com de manera de fer) no dubtaria gens en dir que ha estat el Vicent. Espero que se me n'hagi enganxat alguna cosa. I la conjunció entre la Carme i el Vicent és l'Antoni, no hi havia dia que no em sorprengués, que no tingués ganes d'ajudar o que no fés

més fàcil qualsevol “*dia de binding*”. Parlant de posar les coses fàcils, la Pepi n’és el principal exponent, i a més, qui més pot trobar ofertes com les seves? Tampoc puc oblidar-me de l’Enric i les seves lliçons magistrals sobre nutrició, astronomia i país, òviament (sic) sempre s’entenen millor amb una copa de cava a la mà, o una tassa de cafè llet amb cava, com és tradició al grup.

He conegut a molta gent des que vaig entrar al grup, i he d’agraïr “*als que ja no hi són*” que m’acollissin tant bé. En especial al Jorge que després d’haver-me d’aguantar durant els anys d’institut, de química i de bioquímica va haver-me d’aguantar també al grup, afortunadament, es va poder escapar del meu dia a dia i ara només m’ha d’aguantar durant els caps de setmana... bé, vull dir, els caps de setmana que no té cap cèl·lula a transfectar. També he d’agraïr a l’Òria i a l’Arnau que ens hagin deixat una mica de la seva *mama* per nosaltres i que sàpiguen que sense ella (i el seu pragmatisme) res hauria estat igual, no saben la sort que tenen. No em puc oblidar tampoc de la capitana Aroa, de la Nuri, de la Carla, la Laia, ni de l’acudit de “*la pajita*” del Chema, i sobretot no em puc oblidar de l’altra Laia, que és una mica com el Jorge, i després d’haver estudiat junts i haver estat sempre la meva companya oficial d’esmorzars també ens va abandonar. També estaran molt de sort els nens que la tinguin com a mestra. I va anar arribant gent, el Víctor que aviat va assolir el grau de *jedi* i va adoptar al Newton (qui és Newton?). I l’Estefanía que va adoptar a l’Edu, o era al revés? Perquè l’Edu va adoptar al Dani, i el Dani a la Júlia, i uf... què complicat! Però per sort sempre hi havia la Jasmina per treure’n l’aigua clara, i ja sigui amb soborns de “mil euros” o a base de decapitacions sempre aconseguix que les coses funcionin com han de funcionar. De fora van venir la Patri *colifloreta*, la Milena, sempre disposada a entendre’t, i la Jana, sempre disposada a fer-se entendre; i que encara que no ho sembli, l’entenc més del que es pensa. I la Jana va esclavi... va acollir al Marc, a qui no perdonaré que hagi batut el meu rècord de binding. Hi ha hagut tanta gent que em sembla impossible no deixar-me ningú: la Lucía, el Carles, l’F... la gent que no són del laboratori però és com si ho fossin: el Ferran, el Darko, el Jordi... I és clar, no puc acabar aquesta part sense mencionar a la persona més especial que he conegut al grup, la Marta.

"I asked the question for the best reason possible, for the only reason, indeed, that excuses anyone for asking any question – simple curiosity"

Oscar Wilde, *The Picture of Dorian Gray*

ÍNDIX

I. Introducció

1. Receptors acoblats a proteïna G	15
1.1 Estructura i funció dels GPCR.....	15
1.2 Classificació dels GPCR.....	18
1.3 Proteïnes que interaccionen amb els GPCR	21
2. Oligomerització dels GPCR.....	23
2.1 Evidències de l'oligomerització dels GPCR.....	23
2.2 Arquitectura dels heteròmers	24
2.3 Tècniques per a l'estudi de l'oligomerització	27
2.3.1 Unió de lligands a receptors oligomèrics.....	30
2.4 Conseqüències funcionals de la dimerització dels GPCR	33
3. Receptors de dopamina i d'adenosina	38
3.1 Receptors de dopamina	38
3.1.1 Estructura i classificació dels receptors de dopamina	38
3.1.2 Circuitus dopaminèrgics i ganglis basals.....	42
3.1.3 La malaltia de Parkinson i els models animals per al seu estudi.....	45
3.1.4 Implicació dels receptors de dopamina en els efectes de la cocaïna	52
3.2 Receptors d'adenosina	55
3.2.1 Estructura i classificació dels receptors d'adenosina	55
3.2.2 Paper de l'adenosina al SNC.....	58
3.3 Interrelació entre els receptors A _{2A} d'adenosina i D ₂ de dopamina a l'estriat	60

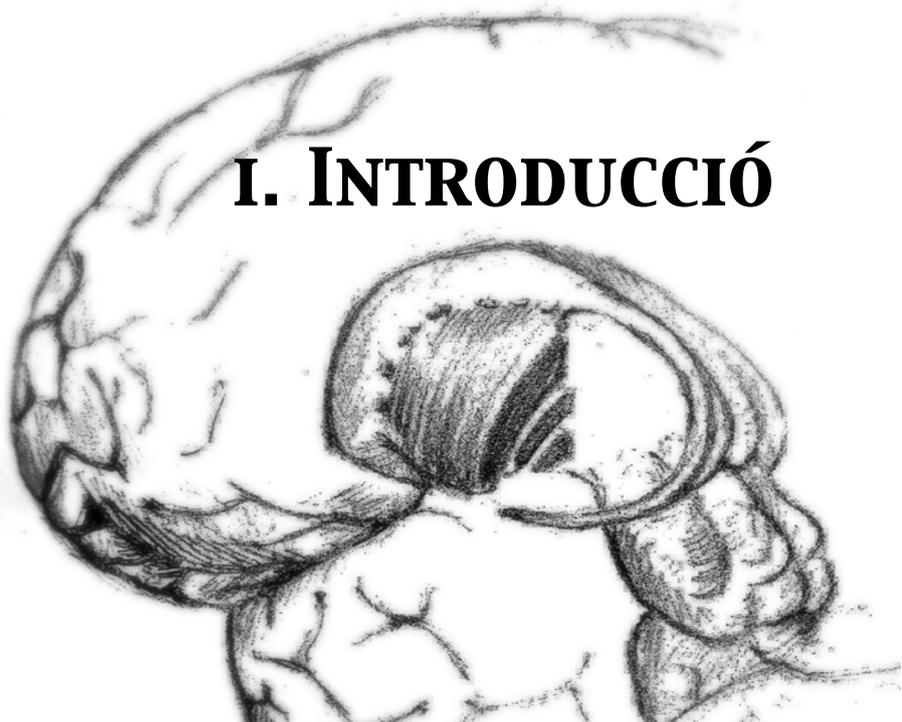
4. Receptors de cannabinoides	63
4.1 Interaccions entre els receptors CB ₁ de canna- binoides, D ₂ de dopamina i A _{2A} d'adenosina	66
II. Objectius	73
III. Materials i mètodes	79
IV. Resultats i discussió	103
Capítol 1: <i>Estudi de la dinàmica del receptor D₂ de dopamina mitjançant la microscòpia confocal de disc giratòri</i>	103
Capítol 2: <i>Paràmetres farmacològics per a receptors dimèrics obtinguts a partir d'experiments de competició. Modulació agonista-antagonista</i>	119
Capítol 3: <i>El descobriment d'un nou agonista amb afinitat i selectivitat per als receptors D₂ de dopamina</i>	135
Capítol 4: <i>La cocaïna inhibeix la senyalització del receptor D₂ de dopamina a través dels heteròmers de receptors σ_1-D₂</i>	149
Capítol 5: <i>Interaccions al·lostèriques entre receptors a l'heteròmer A_{2A}-D₂ induïdes per agonistes i antagonistes</i>	169
Capítol 6: <i>La L-DOPA inhibeix l'expressió dels heteròmers de receptors d'adenosina A_{2A}-de cannabinoides CB₁- i de dopamina D₂ en models animals de la malaltia de Parkinson</i>	187
V. Conclusions	211
VI. Bibliografia	217
VII. Apèndix	237

LLISTAT D'ABREVIATURES

2-AG	2-araquidonoilglicerol
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
7-TM	7 Dominis Transmembrana
AC	Adenilat Ciclasa
ADA	Adenosina Desaminasa
Ado	Adenosina
Ahx	Àcid aminohexanoic
AIM	Moviment anormal involuntari
Ala	Alanina
AMP	Monofosfat d'adenosina
Amp	Aminoprolina
AMPc	AMP cíclic
Arg	Arginina
Asp	Àcid aspàrtic
ATP	Trifosfat d'adenosina
BiFC	Complementació bimolecular de fluorescència
BRET	Transferència d'energia bioluminiscent per ressonància
BSA	Albúmina sèrica bovina
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CoIP	Coimmunoprecipitació
DA	Dopamina
DARPP-32	<i>Dopamine and cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate Regulated PhosphoProtein</i>
DAT	Transportadors de dopamina
DD	Asp-Asp
DMT	N,N-dimetiltriptamina
DRY	Motiu Aso-Arg-Tyr
ECL	Bucles Extracel·lulars
EE	Glu-Glu
ER	Reticle Endoplasmàtic
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EYFP	Proteïna fluorescent groga millorada
FBS	Sèrum fetal boví
fMRI	Ressonància magnètica funcional d'alta resolució
FRET	Transferència d'energia fluorescent per ressonància
GABA	Àcid γ -aminobutíric
GFP	Proteïna fluorescent verda
Glu	Àcid glutàmic / glutamat
GPCR	Receptor acoblat a Proteïna G
GP _e	<i>Globus pallidus</i> extern
GP _i	<i>Globus pallidus</i> intern
GRK	Cinases de GPCR
G _{α}	Subunitat α de la Proteïna G
G _{$\beta\gamma$}	Dímer $\beta\gamma$ de la Proteïna G
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
ICL	Bucles Intracel·lulars
IP	Immunoprecipitació
IP ₃	Inositol trifosfat

KK	Lys-Lys
KO	<i>Knock-out</i>
L-DOPA	Levodopa
LB	Cossos de Lewy
Leu	Leucina
LID	Discinèsia induïda per L-DOPA
Lys	Lisina
MAO-B	Monoamina oxidasa B
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
mcBiFC	Complementació bimolecular de fluorescència multicolor
MFB	<i>Medial forebrain bundle</i>
mGlu	Receptor metabotròpic de glutamat
MPDP	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridoni
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridoni
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
mRNA	RNA missatger
NAc	<i>Nucleus accumbens</i>
NAD ⁺	Dinucleòtid de nicotina i adenina
NADA	N-araquidonoïldopamina
Nle	Norleucina
PBP	Proteïnes bacterials d'unió periplasmàtica
PD	Malaltia de Parkinson
PEI	Polietilenimina
Phe	Fenilalanina
PKX	Proteïna Cinasa "X"
PLA	<i>Proximity ligation assay</i>
PLC	Fosfolipasa C
PP-X	Proteïna fosfatasa "X"
PPN	Nucli pedunculopontí
Pro	Prolina
PTH	Hormona Paratiroide
RAMP	Receptor Activity Modifying Proteins
RET	Transferència d'energia per ressonància
RKR	Arg-Lys-Arg
RLuc	<i>Renilla Luciferasa</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RR	Arg-Arg
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	Sistema Nerviós Central
SN _C	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SN _R	<i>Substantia nigra pars reticulata</i>
SRET	Transferència seqüencial d'energia per ressonància
STN	Nucli subtalàmic
THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
Thr	Treonina
TM o TMD	Domini transmembrana
Trp	Triptòfan
Tyr	Tirosina
VIP	Pèptid Vasoactiu Intestinal
VTA	Àrea ventral tegmental
WT	<i>Wild-type</i>
YFP	Proteïna fluorescent groga

I. INTRODUCCIÓ



I. INTRODUCCIÓ

1. Receptors acoblats a proteïna G.

Els receptors acoblats a proteïna G (*G protein coupled receptors* – GPCR) o receptors de 7 dominis transmembrana (7-TM) són la superfamília de proteïnes que constitueix el major i més versàtil grup de receptors de la superfície cel·lular implicats en la transducció de senyals. En humans, més de l'1% del genoma codifica per més de 1.000 proteïnes, un 90% de les quals s'expressen al Sistema Nerviós Central (SNC). (Guddermann et al, 1997; George et al, 2002).

La diversitat química per als lligands endògens d'aquests receptors és gran i s'hi inclouen amines biogèniques, pèptids, glucoproteïnes, lípids, nucleòtids i ions (Kolakowski, 1994). A més la percepció d'estímuls exògens també està mitjançada per GPCR incloent-hi la llum, el gust i l'olfacte (Figura 1). S'ha estimat que la meitat dels fàrmacs moderns tenen a aquests receptors com a diana i diversos lligands per a GPCR es troben entre els 100 fàrmacs més venuts a nivell mundial (Flower, 1999). És evident que aquests fàrmacs només abracen una petita proporció de la superfamília dels GPCR i d'aquí que el potencial per descobrir nous agents terapèutics en aquest camp és encara molt gran.

1.1 Estructura i funció dels GPCR.

Els receptors acoblats a proteïna G tenen 7 fragments de seqüència que travessen la membrana plasmàtica: són dominis d'entre 25 i 35 aminoàcids consecutius i d'una hidrofobicitat relativament alta, i formen una unitat de reconeixement i transmissió d'estímuls extracel·lulars cap a l'interior de la cèl·lula. L'extrem N-terminal de la proteïna es troba a l'espai extracel·lular

mentre que l'extrem C-terminal està a l'interior. La primera estructura cristal·lina d'un GPCR va aparèixer l'any 2000 (Palcewski et al, 2000) i va ser l'estructura d'alta definició del receptor de rodopsina bovina. Es va confirmar que les 7 hèlix- α transmembrana es col·locaven en un feix empaquetat formant el nucli del receptor i que s'unien per 3 bucles intracel·lulars (ICL) i 3 d'extracel·lulars (ECL).

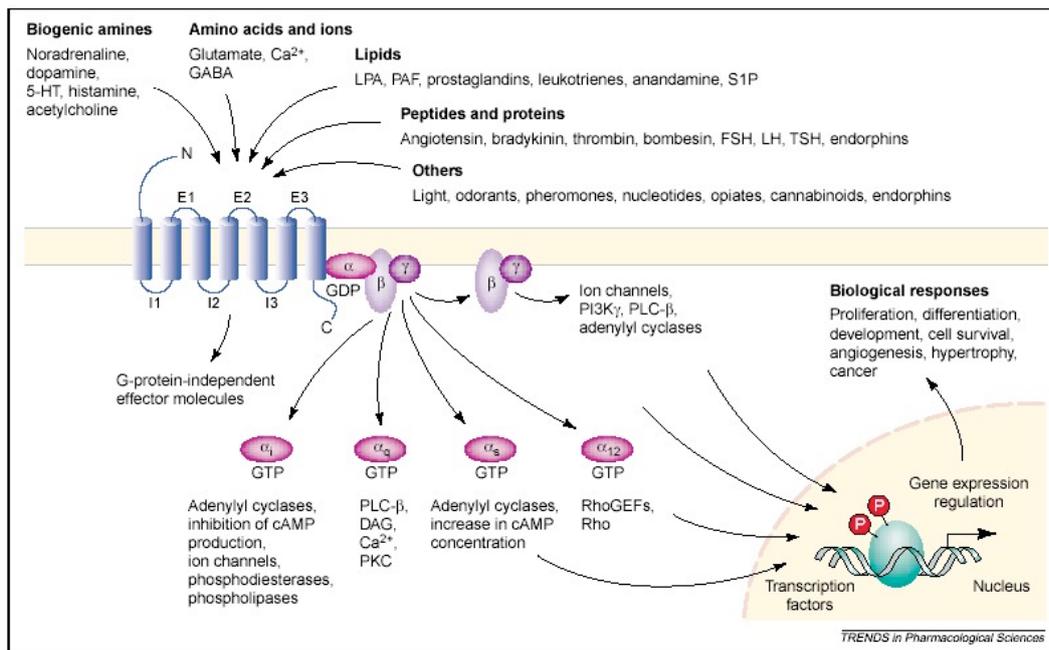


Figura 1. Lligands endògens i mecanismes de senyalització cel·lular dels GPCR. Una àmplia varietat de lligands actuen sobre els GPCR, que mitjançant diferents vies de senyalització, regulen funcions biològiques clau com la proliferació cel·lular, la supervivència cel·lular o l'angiogènesi. *Extret de Marinissen i Gutkind, 2001*

La correcta integració i orientació del polipèptid es dona al reticle endoplasmàtic (ER) i les hèlix- α són estabilitzades dins la bicapa lipídica degut a la hidrofobicitat de la molècula, orientant els residus polars cap al nucli del feix, minimitzant així les interaccions amb l'entorn hidrofòbic de la bicapa. Finalment, en un segon estadi es forma l'estructura terciària funcional amb interaccions específiques entre hèlix i hèlix donant lloc a una estructura compacta en forma d'anell dels dominis transmembrana.

Un altre tret definitori dels GPCR és el fet d'interaccionar amb una proteïna trimèrica G –una unitat bescanviadora de nucleòtids de guanina-, de la qual se'n derivarà gran part de la capacitat de senyalització del receptor. Tal com es mostra a la Figura 1 alguns dels mecanismes de senyalització depenen de la

INTRODUCCIÓ

RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G

interacció entre el receptor i la proteïna G: després de l'activació del receptor, es produeix un canvi conformacional que es transmet cap a la subunitat α (G_α) de la proteïna G, la qual bescanvia un nucleòtid de GDP per un de GTP. Això provoca que la forma amb GTP unit a la subunitat α es dissociï del receptor i del dímer $\beta\gamma$ ($G_{\beta\gamma}$) (Marinissen i Gutkind, 2001). Les dues subunitats resultants, G_α unida a GTP i $G_{\beta\gamma}$ són capaces d'activar o modular diferents vies de senyalització cel·lular que poden incloure, entre d'altres, activació o inhibició d'adenil ciclases, activació de fosfolipases, o regulació de canals de potassi o de calci (Hamm, 1998).

Malgrat això, els mecanismes d'acció dels GPCR són complexos i més recentment s'ha vist que poden actuar per mecanismes de senyalització independents de proteïna G (Daaka et al. 1998; Lefkowitz, 1998). S'ha suggerit que la fosforilació dels receptors (mitjançada pels seus propis agonistes) a través de GRK (cinases de GPCR) i la subsegüent captació d'arrestina i segrest dels receptors de la superfície cel·lular (Krupnic i Benovic, 1998) cap a vesícules d'endocitosi no són només mecanismes per disminuir la capacitat de senyalització dels receptors a la membrana sinó que els endosomes poden constituir plataformes on té lloc la senyalització independent de proteïna G, com per exemple l'activació de la via de les MAPK (Ferguson, 2001; Lutrell i Lefkowitz, 2002).

L'exposició dels GPCR als seus agonistes sovint condueix a una reducció de la capacitat de resposta del receptor. Aquesta desensibilització és conseqüència de diferents mecanismes que inclouen el desacoblament del receptor de la seva proteïna G en resposta a la fosforilació del receptor (Hausdorff et al., 1989; Lohse et al., 1990), la internalització del receptor de la membrana plasmàtica cap a diferents compartiments intracel·lulars (Hermans et al., 1997; Trejo et al., 1998) i un moderat decrement de la quantitat total de receptors a la cèl·lula que es duu a terme a través de mecanismes per reduir la quantitat de mRNA i de síntesi de proteïna i incrementar la degradació lisosomal dels receptors existents (Jockers et al., 1999; Pak et al., 1999). Aquests tres processos ocorren a diferents marges de temps, des de segons (fosforilació) a minuts (endocitosi) o a hores (disminució de receptors), i la mesura de la desensibilització varia des de la completa eliminació del senyal (observada per als sistemes olfatori o visual) fins a l'atenuació de la potència dels agonistes observada per als receptors β_2 -adrenèrgics (Sakmar, 1998). La diferent desensibilització dels receptors és regulada per diversos factors que formen part tant de l'estructura del receptor com de l'ambient cel·lular en què es troba.

Està àmpliament acceptat que tant cinases activades per segons missatgers (PKA o PKC) o GRK fosforilen residus de serina o treonina tant dels bucles intracel·lulars com dels dominis carboxi-terminals (Lefkowitz, 1993; Krupnick i Benovic, 1998). Les cinases activades per segons missatgers no només fosforilen els receptors activats per l'agonista sinó que ho fan inespecíficament a receptors no activats (Hausdorff et al. 1989), mentre que les GRK fosforilen selectivament receptors activats on afavoreixen la unió dels factors citosòlics, anomenats arrestines, que desacoblen el receptor de la proteïna G (Lohse et al., 1990).

La internalització dels GPCR, si bé en part és un procés de desensibilització, també ha de ser vista com un procés de resensibilització: una gran part dels receptors desacobrats per fosforilació són transportats a vesícules endosomals on poden ser desfosforilats i reciclats un altre cop cap a la superfície cel·lular (Krueger et al., 1997). Aquest procés es dona en contraposició a la regulació a la baixa dels receptors després d'una exposició prolongada als agonistes, en què els receptors són conduïts a vies de degradació (Bohm et al., 1997). Així, un cop internalitzats els GPCR poden experimentar dos fenòmens: el reciclatge o la degradació. I tal com alguns receptors poden ser reciclats en minuts –com el β_2 -adrenèrgic (Pippig et al., 1995)– altres són retinguts a l'interior cel·lular períodes més llargs –com la vasopressina de tipus 2 (Innamorati et al., 2001)– mentre que altres com els δ -opioides o el receptor de trombina són degradats (Tsao i von Zastrow, 2000). Les GRK i les β -arrestines semblen tenir la clau en la regulació de la internalització dels GPCR ja que tot indica que poden interaccionar amb les vesícules de clatrina que formen la via d'endocitosi més ben caracteritzada per a molts tipus de receptors. Tot i així, existeixen altres vies alternatives de reciclatge que són independents del sistema β -arrestina/clatrina. De totes maneres, la desensibilització i endocitosi també poden actuar per acoblar els receptors a vies de transducció del senyal diferents (Luttrell et al., 1999; DeFea et al., 2000).

1.2 Classificació dels GPCR.

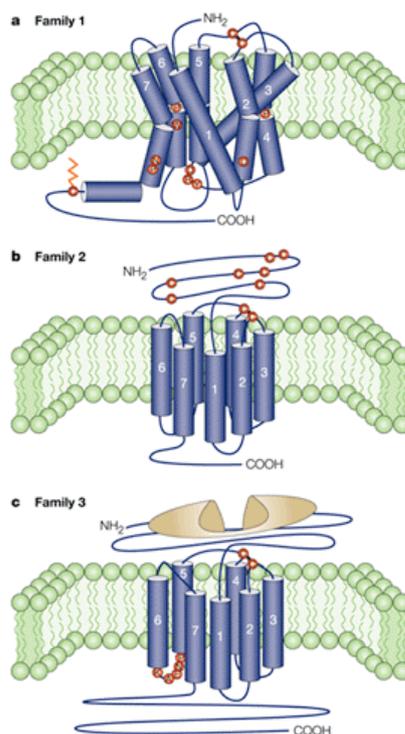
Els receptors acoblats a proteïna G no comparteixen, en general, una homologia en la seva seqüència. L'únic tret estructural comú en tots ells és la presència dels 7 dominis transmembrana connectats amb els bucles alternatius intra i extracel·lulars. A part de les variacions de seqüència, els GPCR es diferencien

INTRODUCCIÓ

RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNA G

per la longitud i la funció dels seus dominis N-terminal extracel·lular, C-terminal intracel·lular i dels 6 bucles alternats. Tot i així, dues cisteïnes (una al ECL1 i una al ECL2) estan conservades en molts GPCR i formen un pont disulfur que pot ser important en el plegament i la restricció conformacional dels dominis transmembrana (Probst et al, 1992; Baldwin, 1994).

Els GPCR s'han classificat en base a diversos sistemes. Un dels més clàssics és el sistema Kolakowski (Kolakowski Jr., 1994) en el qual aquests receptors s'agrupen en 6 famílies (A-F) segons la seva estructura i característiques genètiques. A la Figura 2 es representen les tres famílies majoritàries A, B i C. Hi ha altres subfamílies menors com la D i la E (que són receptors de feromones de llevats) o la família F, formada únicament per 4 receptors de cAMP en *Dictyostelium discoideum* (Kolakowski Jr, 1994).



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 2. Representació esquemàtica de les principals famílies de GPCR. Els dominis transmembrana s'indiquen amb cilindres blaus i els residus conservats amb esferes vermelles. Extret de Gerorge et al., 2002.

La família A (o 1), és de llarg la més gran i la més estudiada. Conté el 90% dels GPCR entre els que s'inclouen la rodopsina i receptors d'una gran varietat d'hormones i neurotransmissors. Hi ha una baixa homologia entre els receptors del tipus A i està concentrada en certs residus aminoacídics clau que estan molt conservats, un fet que suggereix que aquests residus són essencials per a l'estructura i la funció d'aquests receptors. L'únic residu conservat en tota la família A és l'arginina del motiu Asp-Arg-Tyr (DRY) situat a la banda citosòlica del tercer segment transmembrana (Probast et al., 1992) i que es considera involucrat en l'activació de la proteïna G. Molts receptors d'aquesta família tenen una cisteïna palmitoilada a l'extrem carboxi-terminal que serveix d'ancoratge a la membrana plasmàtica. En aquests receptors el lligand s'uneix, normalment, a una cavitat formada pels dominis transmembrana, encara que en alguns casos aquesta interacció té lloc en els bucles extracel·lulars i en el domini N-terminal (George et al., 2002; Jacoby et al., 2006)

La família B (o 2) inclou, aproximadament, 50 receptors diferents per a una varietat d'hormones peptídiques i neuropèptids com el pèptid vasoactiu intestinal (VIP), la calcitonina, la PTH o el glucagó. Excepte pel pont disulfur entre els bucles ECL1 i ECL2 la família B no conté estructures en comú amb la família A i és d'especial interès destacar l'absència del motiu DRY. La característica més notable d'aquesta família és un domini N-terminal extracel·lular gran (d'uns 100 residus) amb diverses cisteïnes capaces de formar una xarxa de ponts disulfur (Ulrich et al., 1998). Així, els lligands peptídics són reconeguts per l'extens domini N-terminal d'aquests receptors (George et al., 2002; Jacoby et al., 2006).

La família C (o 3) inclou els receptors metabotròpics de glutamat, àcid γ -aminobutíric (GABA), calci, vomeronasals, gustatius i de feromones de mamífers. De forma similar a les dues anteriors, conserven les cisteïnes capaces de formar els ponts disulfur entre els ECL1 i 2. En canvi els membres d'aquesta família tenen un domini N-terminal extracel·lular molt gran, significativament relacionat amb les proteïnes bacterianes d'unió periplasmàtica (PBP) involucrades en el transport de molècules. D'altra banda es caracteritzen per tenir un ICL3 curt i altament conservat. Com a conseqüència dels estudis cristal·logràfics amb el receptor metabotròpic de glutamat solubilitzat i unit a glutamat, s'ha proposat que la unió del lligand d'aquests receptors té lloc en el seu extrem amino-terminal extracel·lular (O'Hara et al., 1993; Conn i Pin, 1997).

1.3 Proteïnes que interaccionen amb els GPCR.

Molts GPCR contenen motius a la seqüència que habiliten la interacció proteïna-proteïna i, per tant, en principi, tenen la capacitat teòrica d'interaccionar amb un ampli rang de proteïnes. Aquestes interaccions poden determinar diverses propietats del receptor com ara la localització (distribució en compartiments) cel·lular i la senyalització, i també afavorir la formació de complexos de proteïnes per integrar-ne llurs funcions (Bockaert et al., 2004; Claeysen et al., 2006).

La topologia dels GPCR ofereix diverses regions per a potencials interaccions. A la banda extracel·lular els bucles són relativament curts i les interaccions es concentren a la part N-terminal més llarga. Cada cop és més evident que les interaccions amb els dominis extracel·lulars juguen un rol important en la farmacologia dels GPCR. Un exemple n'és l'adenosina desaminasa (ADA), proteïna multifuncional que pot estar present a la superfície cel·lular com a ecto-enzim, formant complexos heteromèrics amb els receptors A_1 , A_{2A} i A_{2B} d'adenosina. Aquestes interaccions semblen essencials perquè aquests receptors mostren l'estat d'alta afinitat per llurs lligands fisiològics (Saura et al., 1996; Herrera et al., 2001; Gracia et al., 2008, 2011).

A la banda intracel·lular de la membrana plasmàtica, tant el tercer bucle intracel·lular com l'extrem carboxi-terminal poden tenir una mida considerable en els GPCR, per tant, aquestes regions són les més probables per interaccionar amb proteïnes implicades en la senyalització i la localització subcel·lular, com proteïnes citoesquelètiques o relacionades amb el tràfic de receptors. Aquestes interaccions tenen una durada variable ja que poden ser transitòries (i.e. en senyalització) o més estables. De totes maneres, aquests complexos són considerats dinàmics (Franco, Canals et al., 2003). Un dels exemples clàssics de proteïnes que interaccionen amb els GPCR són els polipèptids d'ancoratge al citoesquelet. És el cas de la α -filamina i els receptors D_2 de dopamina (Lin et al., 2001) o la α -actinina i els receptors d'adenosina (Burgueño et al., 2003).

Les interaccions amb altres proteïnes també es poden donar en la membrana plasmàtica. Des de mitjans dels anys 90 diversos estudis han demostrat l'oligomerització de diferents GPCR (George et al., 2002). Avui en dia s'accepta la formació d'homodímers, heterodímers i oligòmers d'ordre superior com un fet comú en la biologia d'aquests receptors (Agnati et al., 2003; Bouvier, 2001; Devi, 2001; Franco et al., 2003; Prinster et al., 2005; Carriba et al., 2008; Ferré et al.,

2009). També s'assumeix que quan un GPCR participa en un oligòmer poden canviar les seves característiques funcionals, conferint noves propietats al receptor i per tant establint nous mecanismes funcionals que donen lloc a un nivell de complexitat superior que governa la senyalització i la regulació d'aquestes proteïnes (Figura 3).

2. Oligomerització dels GPCR.

2.1 Evidències de l'oligomerització dels GPCR.

Tradicionalment, els mecanismes d'unió de lligands i de transducció de senyal per a receptors acoblats a proteïna G es basaven en què aquests actuaven com a monòmers o proteïnes independents amb estequiometria 1:1 respecte a llur proteïna G. Però certes evidències farmacològiques indirectes van portar a pensar als investigadors que els GPCR podien actuar com a dímers. Les complexes corbes d'unió, tant d'agonistes com d'antagonistes, es van interpretar com a evidències d'una cooperativitat que es podia explicar mitjançant interaccions entre els receptors per formar complexos dimèrics o multimèrics (Franco et al., 1996; Wregget i Wells, 1995).

L'any 1993, Maggio i col·laboradors van suggerir la formació d'heterodímers utilitzant quimeres dels receptors α_2 -adrenèrgics i M_3 muscarínics formades pels cinc primers dominis transmembrana d'un receptor i els dos últims de l'altre i viceversa, amb els quals van realitzar estudis de complementació i coimmunoprecipitació. Quan les quimeres s'expressaven de forma independent no s'observava unió de lligands ni la seva consegüent senyalització, mentre que si eren transfectats de forma conjunta es restablí la unió i la senyalització tant per a lligands adrenèrgics com muscarínics (Maggio et al., 1993). Així doncs, l'oligomerització dels GPCR no està limitada a l'homomerització –l'associació física entre dues proteïnes idèntiques– sinó que també es dona el fenomen de l'heteromerització, és a dir, l'associació del receptor amb altres de diferent tipus, ja sigui en forma de dímers o d'oligòmers d'ordre superior. Malgrat això, els oligòmers sovint són tractats com a dímers, entenent-los com la unitat funcional més simple, a causa de la complexitat tècnica per estudiar oligòmers d'ordre superior.

Sense les interaccions entre GPCR no es podria entendre el variat *cross-talk* que s'observa entre receptors de neurotransmissors, i aquestes heteromeritzacions permeten formular hipòtesis sobre l'alt grau de diversitat i plasticitat d'una estructura tant altament complexa i organitzada com és el cervell. S'han descrit fins i tot nivells superiors d'organització en què els GPCR no només formen homòmers o heteròmers sinó complexos supramoleculars constituïts per més d'un tipus d'oligòmers de receptors i una varietat de proteïnes que modifiquen l'activitat dels receptors RAMP (*Receptor Activity Modifying Proteins*). Aquests complexos interaccionen a la membrana plasmàtica i en ser activats per

hormones o neurotransmissors es redistribueixen donant lloc a clústers de receptors que també es poden regular per altres receptors i per altres molècules encara que no tinguin una interacció física directa (Franco et al., 2003).

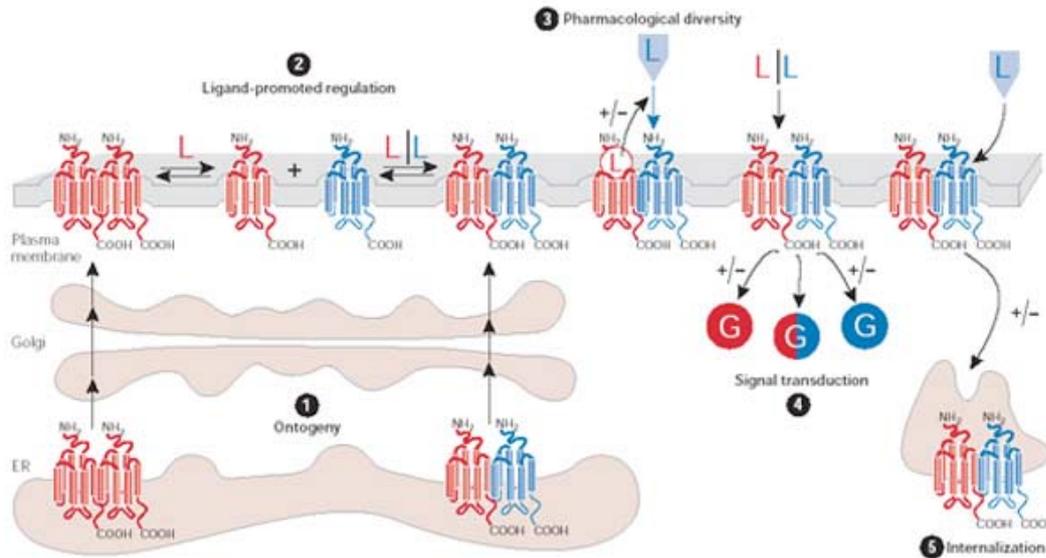


Figura 3. Propietats de l'heterometització dels receptors. El fet que un receptor oligomeritzi pot significar una alteració de les seves propietats dins la cèl·lula a nivell de localització cel·lular (1), modulació per lligands (2), de diversitat farmacològica (3), transducció del senyal (4), o d'internalització (5). *Extret de Terrillon i Bouvier, 2004.*

El nombre i la complexitat creixent de publicacions en aquest camp ha fet necessari establir noves definicions i dotar d'una nomenclatura concreta els oligòmers de receptors acoblats a proteïna G i els seus fenòmens associats, tal com van publicar recentment Ferré i col·laboradors (Ferré et al., 2009).

2.2 Arquitectura dels heteròmers.

Per explicar el fenomen de l'heteromerització dels receptors acoblats a proteïna G es poden considerar dues possibilitats: una interacció directa en la que hi hagi contacte físic entre els receptors, o una interacció indirecta en la que siguin necessàries altres proteïnes que facin de pont, com podrien ser les del citoesquelet.

En el cas de les interaccions indirectes, els dominis dels GPCR, com ja s'ha dit anteriorment, s'uneixen a un gran nombre de proteïnes citosòliques, algunes de les quals han estat possibles candidates per participar en la dimerització dels receptors amb què interaccionen. Moltes d'aquestes són proteïnes bastida (*scaffolding proteins*) que proporcionen una estructura complexa en la que

diversos receptors poden interaccionar entre ell i amb altres proteïnes involucrades en la transducció del senyal, controlant-ne la velocitat i l'especificitat (Ciruela et al., 2005).

En el cas de les interaccions directes es creu que els heteròmers es formen al reticle endoplasmàtic, fet pel qual no són modulables per lligand, entenenent com a modulació la formació o destrucció de l'heteròmer. La gran complexitat estructural presentada per la superfamília dels GPCR no permet pensar en un sol mecanisme d'interacció directa (Bouvier, 2001), així doncs aquesta pot tenir un caràcter covalent, mitjançant ponts disulfur, o no covalent (forces hidrofòbiques i electrostàtiques) entre els dominis transmembrana o intracel·lulars dels receptors (Figura 4).

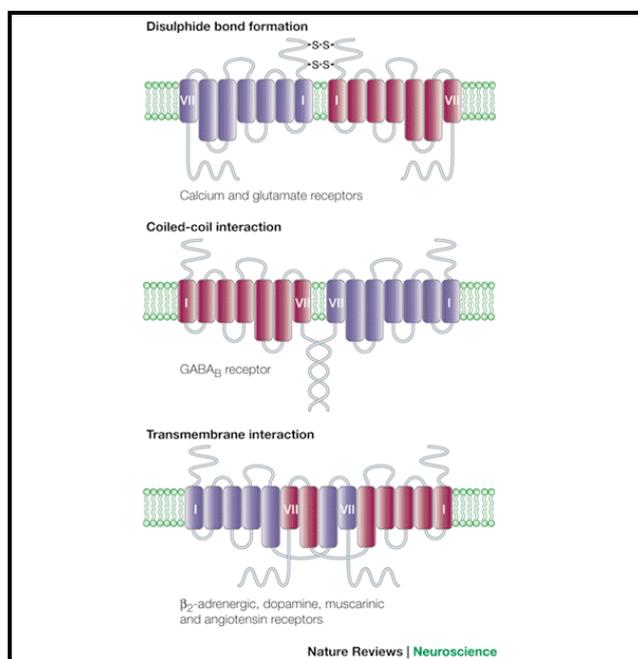


Figura 4. Representació esquemàtica de diferents tipus d'interaccions descrites en GPCR. *Extret de Bouvier, 2001.*

Pels membres de la família C dels GPCR el gran domini N-terminal extracel·lular conté varis residus de cisteïna que poden contribuir a la dimerització mitjançant ponts disulfur. Aquest seria el cas dels receptors sensibles a calci amb els metabotròpics de glutamat (Robbins et al., 1999; Romano et al., 2001) així com d'alguns receptors de la família A com els κ- i δ-opioides o els D₁ de dopamina (Cvejic i Devi, 1999; Jordan i Devi, 1999). També s'han descrit interaccions en què el domini C-terminal és fonamental, com és la dimerització del receptor δ-

opioide (Cvejic i Devi, 1997) o la interacció directa d'hèlix superenrotllada (*coiled-coil*) de la cua intracel·lular del receptors GABA β_1 i GABA β_2 (Margeta-Mitrovic et al 2000; White et al., 1998).

Finalment, la interacció directa pot estar mitjançada per interaccions hidrofòbiques o electrostàtiques entre els dominis intracel·lulars, extracel·lular o transmembrana del receptor. S'han demostrat interaccions iòniques entre pèptids presents als dominis intracel·lulars que contenen dues o més càrregues positives adjacents (RR, KK o RKR) i dues o més càrregues negatives (DD, EE o residus fosforilats) (Woods i Huestis, 2001). Un exemple d'aquest tipus interacció seria la que presenta la dimerització dels receptors A $_{2A}$ d'adenosina o D $_2$ de dopamina (Ciruela et al., 2004) o les que es donen en l'heterotrímer entre els receptors A $_{2A}$ d'adenosina, D $_2$ de dopamina i CB $_1$ de cannabinoides (Navarro et al., 2010). La idea de les interaccions hidrofòbiques podria tenir un paper rellevant en la formació de dímers del receptor β_2 -adrenèrgic, concretament certs residus de glicina i leucina del sisè domini transmembrana (Herbert et al., 1996). També s'han proposat aquest tipus d'interaccions entre dominis transmembrana per a la dimerització dels diferents receptors de dopamina (Ng et al., 1996). De totes maneres, tots aquests mecanismes d'interacció proposats, més enllà d'il·lustrar diferents estratègies utilitzades per diferents classes de receptors indiquen múltiples llocs d'interacció implicats en l'assemblatge i l'estabilització dels heteròmers.

Mitjançant estudis computacionals, Gouldson i col·laboradors van proposar dos models tridimensionals alternatius per explicar la dimerització dels GPCR (Gouldson et al, 2000). En ambdós models es proposa que els dominis TM5 i TM6 estarien involucrats en la interfície o zona de contacte entre receptors, en la qual també hi tindria un paper important el bucle ICL3 (Figura 5).

El primer model, conegut com a model d'intercanvi de dominis (*domain swapping model*) o model d'intercanvi de dominis considera que cada unitat funcional del dímer està formada pels dominis TM1 a TM5 d'un receptor i els TM6 i TM7 de l'altre. Així si es coexpressen ambdues parts per separat es recupera el receptor funcional (Scarselli et al., 2000) i es racionalitza la complementació funcional entre les quimeres dels receptors α_2 -adrenèrgic i M $_3$ muscarínic que s'ha comentat anteriorment (Maggio et al., 1993). El segon model és el de contacte i considera que el dímer es formaria per empaquetament lateral de monòmers individuals on els dominis TM5 i TM6 de cada monòmer formarien la interfície d'interacció. Seria el cas del receptor V $_2$ de vasopressina (Schultz et al., 2000).

De tota manera, la validació d'aquests models encara està pendent i dependrà en gran mesura de la resolució de l'estructura cristal·lina dels oligòmers de GPCR.

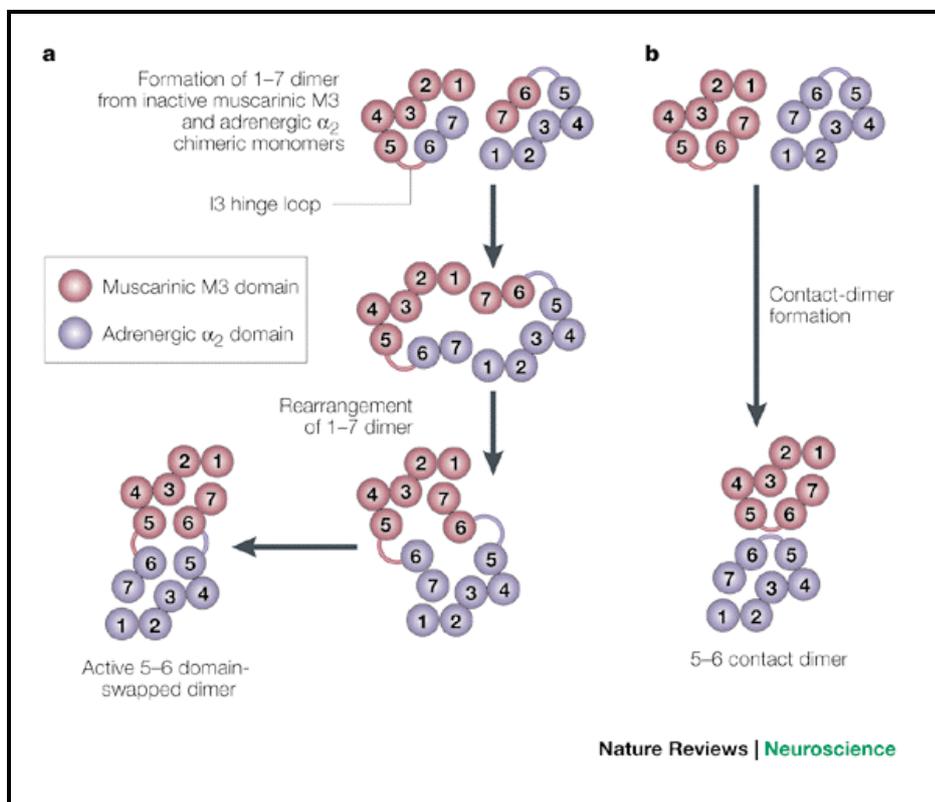


Figura 5. Dos models de dimerització dels GPCR. Extret de Bouvier, 2001.

2.3 Tècniques per a l'estudi de l'heteromerització dels GPCR

Tal com s'ha comentat anteriorment l'estudi dut a terme per Maggio et al. el 2003, utilitzant receptors mutants i quimeres, demostrant que els GPCR podien funcionar com a dímers, va ser un treball pioner en la utilització de mutants per a estudiar l'oligomerització dels GPCR. Seguint aquesta línia, s'ha observat que diferents receptors mutants inactius actuen com a dominants negatius quan són coexpressats amb el receptor en la seva forma nativa (Benkirane et al., 1997; Bai et al., 1998; Zhu i Wess, 1998), en aquests casos la dimerització entre el receptor salvatge (*wild-type*) i el receptor inactiu és la única explicació d'aquest fenomen.

Una de les tècniques bioquímiques clàssiques més usades per investigar la dimerització dels GPCR ha estat la coimmunoprecipitació de receptors amb

epítops diferents. El primer estudi aplicat a l'oligomerització de GPCR que va utilitzar aquesta tècnica va demostrar la interacció específica entre receptors β_2 -adrenèrgics (Hebert et al., 1996). Des d'aleshores s'han usat estratègies similars per a la identificació d'homòmers d'altres receptors com el metabotròpic mGlu₅ de glutamat (Romano et al., 1996), els δ -opioides (Cvejic i Devi, 1997) i els receptors 5-HT_{2C} de serotonina (Herrick-Davis et al., 2004), entre d'altres. Els estudis de coimmunoprecipitació també s'han usat per demostrar l'heteromerització de receptors del mateix neurotransmissor, com ara GABA_{B1} i GABA_{B2} (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998) o com els κ - i δ -opioides (Jordan i Devi, 1999) o fins i tot entre receptors de diferents hormones com els receptors A₁ d'adenosina i D₁ de dopamina (Ginés et al., 2000), els A_{2A} d'adenosina i metabotròpic mGlu₅ de glutamat (Ferré et al., 2002) o els receptors de cannabinoides CB₁ i D₂ de dopamina (Kearn et al., 2005).

Tot i que la immunoprecipitació és una tècnica que es fa servir de manera habitual per estudiar les interaccions proteïna-proteïna, en el cas dels GPCR requereix la solubilització de les membranes mitjançant detergents, i pot provocar la formació de dímers artefacte per una solubilització incompleta, a causa de la naturalesa hidrofòbica d'aquests receptors. A pesar dels controls usats per descartar aquesta possibilitat, l'acceptació generalitzada de la dimerització dels GPCR depenia d'una demostració directa que aquests complexos podien existir en cèl·lules vives. Això va ser possible amb el desenvolupament de mètodes biofísics basats en la transferència d'energia de ressonància (RET; *resonance energy transfer*).

L'any 1948, Theodor Förster va formular la teoria de la transferència d'energia de ressonància (Förster, 1948) molt abans que fos aplicada a l'estudi de les interaccions entre GPCR. Aquesta aproximació biofísica es basa en la transferència d'energia no radiant (dipol-dipol) des d'un cromòfor en estat excitat (anomenat donador) i una molècula propera que l'absorbeix (acceptor). En el cas de la transferència d'energia de ressonància fluorescent (FRET; *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) tant el donador com l'acceptor són molècules fluorescentes, mentre que en el cas de la transferència d'energia de ressonància bioluminiscent (BRET; *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) el donador és una molècula bioluminiscent i l'acceptor és fluorescent. Perquè tingui lloc la transferència d'energia és necessari que s'acompleixin dos requisits: el primer consisteix en que l'espectre d'emissió del donador i el d'excitació de l'acceptor s'encavalquin, i el segon és que ambdues molècules

estiguin molt pròximes en l'espai (a menys de 10 nm o 100 Å). Aquest segon requisit és el que permet aplicar la tècnica a l'estudi d'interaccions entre macromolècules, ja que en la majoria de complexos multiproteics d'una cèl·lula es troben a una distància d'entre 10 i 100 Å (Stryer, 1978; Sheng i Hoogenraad, 2007).

Per a la tècnica de FRET s'utilitzen habitualment diferents variants de la proteïna fluorescent verda (GFP), obtingudes per mutació, fusionades als receptors d'interès. Aquestes mutacions confereixen diferents propietats espectrals a les proteïnes de manera que fent-ne servir dues de diferents s'aconsegueix tenir un donador i un acceptor adients. La parella més àmpliament usada per als experiments de FRET és la formada per GFP², que s'excita a 400nm i emet a 510nm, i la variant YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), que s'excita a 485 nm i emet a 530 nm (Pfleger i Eidne, 2005; Gandia et al., 2008). En la tècnica de BRET la bioluminiscència és el resultat de la degradació enzimàtica d'un cert substrat (habitualment Coelenterazine H o Deep Blue C) mitjançant la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc), que genera la llum que és transferida a una variant de les GFP (Pfleger i Eidne, 2005; Gandia et al., 2008).

Hi ha altres tècniques basades en l'ús de proteïnes fluorescents que permeten estudiar les interaccions entre receptors, una d'elles és la complementació bimolecular (BiFC; *Bimolecular Fluorescence Complementation*) que utilitza dos fragments no fluorescents de la proteïna YFP fusionats a dos receptors, que, si estan prou a prop (a menys de 6 nm), són capaços de reconstituir la fluorescència de la molècula (Hu et al., 2002). Posteriorment es va desenvolupar la tècnica de complementació multicolor (mcBiFC) que utilitza diversos fragments de diferents proteïnes facilitant la recerca de xarxes de complexos de proteïnes reguladores (Gehl et al., 2009).

La principal limitació de les tècniques mencionades és que es duen a terme en sistemes d'expressió heteròlegs, i consegüentment poden conduir a artefactes. A més, s'ha de tenir en compte que la capacitat d'oligomerització dels receptors no significa que aquesta es doni *in vivo* amb les mateixes característiques. Tanmateix, un estudi estructural realitzat per Palczewski (Fotiadis et al., 2003), utilitzant microscòpia de força atòmica, va demostrar per primera vegada que la rodopsina s'estructura de forma multimèrica a la retina.

Un cop demostrada la possibilitat de formar oligòmers entre uns GPCR determinats ens calen altres tècniques capaces d'identificar-los en teixits

nadius, o com a mínim trobar-ne alguna o algunes característiques específiques dels heteròmers que puguin constituir les empremtes (*fingerprints*) de l'oligomerització, i que ens puguin donar informació de la seva presència *in vivo*.

2.3.1 Unió de lligands a receptors oligomèrics

Tot i que l'evidència demostra que la majoria de GPCR que es troben a la membrana formen dímers o oligòmers, la majoria de models emprats fins a l'actualitat no tenen en compte aquest factor i els segueixen considerant com a monòmers. Colquhoun (1973) i Thron (1973) van iniciar una sèrie d'estudis que van donar lloc al desenvolupament de diferents models per explicar el comportament de receptors d'hormones i neurotransmissors (De Lean et al., 1980; Costa i Herz, 1989; Lefkowitz et al., 1993; Onaran et al., 1993; Samama et al., 1993; 1994; Leff, 1995; Tucek i Proska, 1995; Franco et al., 1996; Weiss et al., 1996; Hall, 2000; Lorenzen et al., 2002). Tots aquests models tenen en comú que la unitat bàsica de senyalització és el receptor en estat monomèric, i la majoria d'ells es basen en el mecanisme proposat 50 anys abans per Del Castillo i Katz (1957) per explicar el comportament dels receptors nicotínics, que són canals iònics i no GPCR. Aquests autors postulaven que el canal romaní tancat en absència de l'acetilcolina i que un cop unit el lligand progressava en un estat intermedi tancat i que després experimentava un altre canvi conformacional i l'obria, formant-se l'estat actiu del receptor (Fig 6A).

Més endavant, es va proposar el model d'activació en dos estats (*Two-state model of receptor activation*) en què es postula que el receptor té dues formes conformacionals que es troben en equilibri, essent una d'elles la molècula activa, capaç de senyalitzar. En aquest model hi hauria un centre ortoestèric al qual s'uniria l'agonista i seria capaç de desplaçar l'equilibri cap a la forma activa. Aquest model ja era capaç d'explicar l'activitat constitutiva d'alguns receptors i introduïa el concepte d'agonistes inversos (Leff, 1995; Fig. 6B). Altres models més complexos inclouen l'existència de llocs d'unió al·lostèrics per explicar la modulació que sofreixen alguns receptors per molècules que no són l'agonista. El model del complex ternari (*Ternary complex model*) proposat per De Lean et al., l'any 1980 considera la pròpia proteïna G com a modulador no-competitiu, però també es pot generalitzar i considerar qualsevol altre modulador al·lostèric (Fig. 6C). Samama et al., l'any 1993 van expandir aquest model incloent-hi dos estats d'activació en què la proteïna G només s'uneix a l'estat

INTRODUCCIÓ

OLIGOMERITZACIÓ DELS GPCR

actiu i el van anomenar l'extensió del model del complex ternari (*Extended ternary complex model*; Fig. 6D). Finalment, el model del complex ternari cúbic (*Cubic ternary complex model*) combina els models del complex ternari i el d'activació en dos estats (Weiss et al., 1996; Hall, 2000; Fig. 6E).

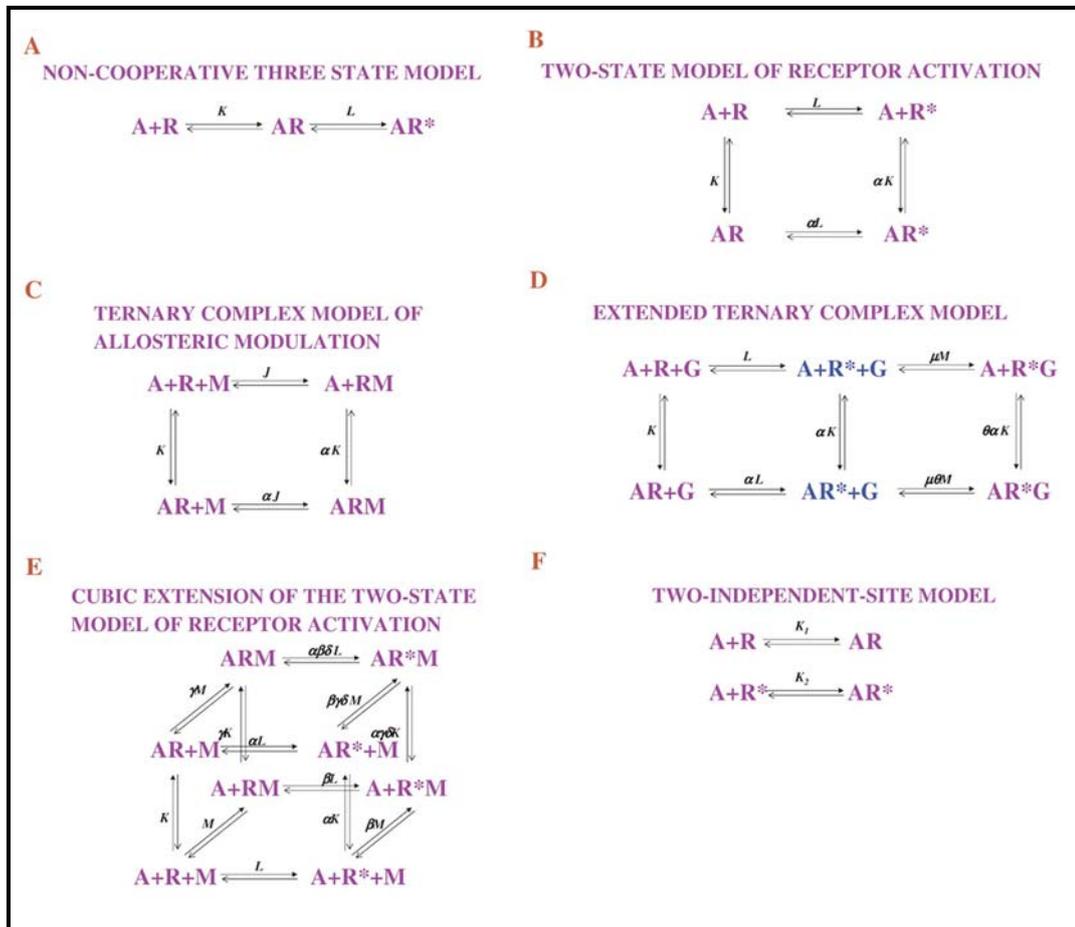


Figura 6. Diferents models que operen assumint que els receptors són monomèrics. R i R* són el receptor, i el receptor activat (p.e. acoblat als mecanismes de senyalització), respectivament. A és l'agonista o antagonista, G és la proteïna G i M és el modulador al·lostèric, que també pot ser una proteïna G. *Adaptat de Casadó et al., 2007.*

Cap d'aquests models, però, és capaç d'explicar satisfactòriament l'existència d'isotermes d'unió bifàsiques o fenòmens de cooperativitat homotròpica. Per solucionar el problema, l'aproximació més comú és la d'addicionar dues isotermes corresponents a dues poblacions de receptor independents i no en equilibri entre ells (Casadó et al., 1990; Fig. 6F), per exemple, una corresponent a un receptor unit a proteïna G i l'altra no. Aquesta aproximació ha estat útil per explicar les corbes bifàsiques. Malgrat això, s'ha vist que alguns agonistes

indueixen canvis en la proporció dels dos estats d'afinitat, cosa que suggereix que no són independents sinó que estan en equilibri, tal com consideraven els models anteriors. En un altre aspecte, aquest model només podria explicar fenòmens de cooperativitat negativa i no explicaria fenòmens de cooperativitat positiva que tot i no ser tant comuns s'han descrit en el cas de receptors muscarínics (Mattera et al., 1985) o de receptors opioides (Jordan et al., 2003; Tomassini et al., 2003). Mattera et al. ja van proposar l'any 1985, quan l'oligomerització dels GPCR no era tant evident, l'existència d'un receptor multivalent amb més d'un centre per a la unió d'agonistes, que permetia explicar aquests fenòmens de cooperativitat.

Donat que els receptors acoblats a proteïna G es troben a la membrana com a dímers (Angers et al., 2002; George et al., 2002; Terrillon i Bouvier, 2004) s'havien de revisar els models anteriors per tenir aquest fet en consideració. De fet, els receptors podrien trobar-se a la membrana com a oligòmers d'ordre superior, l'estequiometria dels quals encara no és del tot coneguda. Malgrat això, models basats en trímers o tetràmers serien matemàticament molt més complexos i tindrien molt poc a afegir en termes d'ajust a dades experimentals, en els que el propi error experimental, inherent a aquest tipus d'experiments, i la limitació de punts no donaria una millora significativa respecte a un model dimèric. Així doncs, tenint en compte tots aquests factors el nostre grup ha desenvolupat un model que considera la unió a receptors dimèrics en dos estats (*Two-state dimer receptor model*) en què la cooperativitat homotròpica s'explica de manera natural assumint que la unió del primer lligand a un monòmer pot modificar els paràmetres d'equilibri de la unió d'una segona molècula de lligand l'altre monòmer del dímer (Franco et al., 2005; 2006; Fig. 7). El *Two-state dimer receptor model* es basa en la possibilitat que els canvis conformacionals d'una subunitat del dímer puguin ser trasmesos a l'altra subunitat, cosa que implica que hi pugui haver una comunicació (*cross-talk*) entre elles. Així, aquest model és capaç d'explicar tant els fenòmens de cooperativitat (positiva o negativa) i altres fenòmens en què altres models fallaven, com és l'activitat constitutiva i els agonistes inversos. A més, el model també explica altres fenòmens com els efectes duals d'alguns compostos, la qual cosa pot ser important per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques.

Un dels aspectes a destacar del *Two-state dimer receptor model* és que, a més de les constants macroscòpiques d'afinitat (K_{D1} i K_{D2}) dels agonistes i antagonistes per als receptors als que s'uneixen, permet calcular nous paràmetres, com ara l'índex de cooperativitat (D_c) que permet avaluar el grau de cooperativitat que

es produeix en l'entrada de la segona molècula de lligand al receptor en el dímer semioocupat. És a dir, D_C és un càlcul de la modificació induïda per la primera molècula de lligand en els paràmetres macroscòpics d'equilibri de la unió de la segona molècula de lligand al receptor dimèric (Casadó et al., 2007). A més, en experiments de competició on hi ha més d'un lligand capaç d'unir-se al receptor apareix el fenomen de la constant d'equilibri híbrida (K_{DAB}), que és la constant de dissociació que mesura l'afinitat d'un lligand (B) per un receptor dimèric quan està semioocupat per un altre lligand diferent (A). Aquest paràmetre esdevé important a l'hora de detectar una possible cooperativitat (*cross-talk* en el llenguatge habitual de senyalització) en experiments de competició i comparar-ne la seva efectivitat.

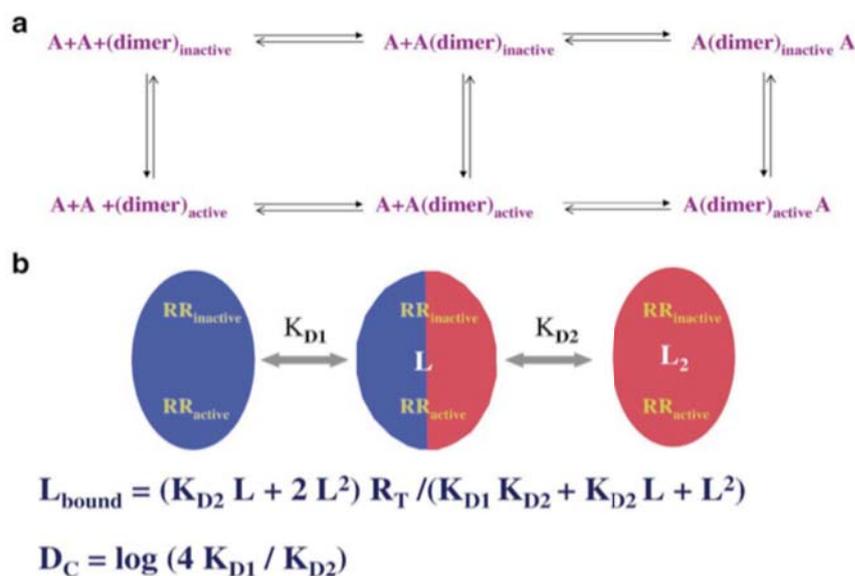


Figura 7. Esquema i equacions del Two-state dimer receptor model. El dímer pot ser inactiu o actiu i pot estar buit o ocupar per una o dues molècules de lligand (A). a) Model macroscòpic. b) Model simplificat que inclou les constants de dissociació macroscòpiques a l'equilibri (K_{D1} i K_{D2}) que defineixen la unió de la primera i de la segona molècula al dímer, respectivament. Es mostren les equacions per a l'ajust dels valors d'unió del radiolligand (L) als receptors que formen el dímer i per calcular-ne l'índex de cooperativitat (D_C). *Extret de Franco et al., 2008.*

2.4 Conseqüències funcionals de la dimerització dels GPCR

La disponibilitat d'un gran nombre de tècniques per a l'estudi de la dimerització dels GPCR ha facilitat la recerca del paper funcional d'aquests receptors. La dimerització està implicada en la regulació de la funcionalitat del receptor a diferents nivells, des de l'expressió del receptor a la superfície cel·lular fins al fet de conferir noves propietats farmacològiques als receptors expressats en

dímers. Això proporciona una altra perspectiva a l'hora de considerar quina és la unitat funcional dels GPCR, a més d'una nova via per al disseny de fàrmacs que actuïn a través dels heteròmers.

Encara que en molts casos no se'n coneix completament la rellevància fisiològica, diversos estudis duts a terme en sistemes d'expressió heteròlegs han suggerit diferents papers funcionals per a l'oligomerització dels GPCR (Figura 8). Pot estar implicada en l'ontogènesi dels receptors, és a dir, en el control del plegament i de la destinació a la membrana dels receptors sintetitzats *de novo*. Tanmateix, en alguns casos, també s'ha observat que la regulació de la formació o separació dels heteròmers presents a la membrana plasmàtica pot estar mitjançada pel lligand. Com s'ha comentat anteriorment, l'oligomerització també confereix als receptors diversitat farmacològica, ja que la unió d'un lligand a un dels receptors pot influir en la unió de l'altre lligand a un altre centre de l'oligòmer (Ferré et al., 2007; Franco et al., 2008). L'heteromerització no tal sols pot afectar als processos que es donen a nivell de membrana sinó que també pot modificar les propietats de senyalització d'un determinat receptor, afectant a la selectivitat d'aquest per a una determinada proteïna G, resultant en una potenciació, atenuació o un canvi de vies de senyalització. Finalment, també s'ha vist que l'oligomerització pot alterar el patró endocític per a un determinat receptor (Figura 8; Terrillon i Bouvier, 2004).

Un exemple paradigmàtic de la funcionalitat de la dimerització entre receptors el constitueixen els receptors metabotrópics GABA_B, on l'heteromerització dels subtipus GABA_{B1} i GABA_{B2} és necessària per al correcte plegament dels receptors i el seu transport a la membrana, i per a la seva senyalització. Tres estudis simultanis apareguts el 1998 demostraven que era necessària la coexpressió d'ambdues isoformes per a la formació del receptor funcional a la membrana (Jones et al., 1998; Kaupman et al., 1998; White et al., 1998). Quan s'expressa individualment el receptor GABA_{B1} queda retingut al reticle endoplasmàtic com una proteïna immadura. Per contra, la forma GABA_{B2} és capaç d'arribar a la membrana plasmàtica, però no és capaç d'unir GABA ni d'iniciar la transducció de senyal (White et al., 1998). En estudis posteriors s'ha demostrat que GABA_{B2} actua com una xaperona en el plegament i transport de GABA_{B1} (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Aquestes evidències, juntament amb el fet que un mutant de la isoforma GABA_{B1} amb capacitat d'assolir la membrana plasmàtica tampoc és capaç d'iniciar la transducció de senyal, van suggerir que la unitat funcional del receptor havia de ser l'heterodímer (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Això no obstant, tenint en compte les recents definicions sobre

receptors aportades per un grup d'experts (Ferré et al., 2009) que defineixen al receptor com una macromolècula o conjunt mínim de macromolècules hàbils per induir una senyalització, i tenint en compte que els receptors poden tenir estructura quaternària, s'hauria de considerar a la unitat funcional GABA_{B1}-GABA_{B2} com un únic receptor heteromèric. És a dir, com a un sol receptor amb una determinada estructura quaternària i no un heteròmer de receptors GABA (Ferré et al., 2009).

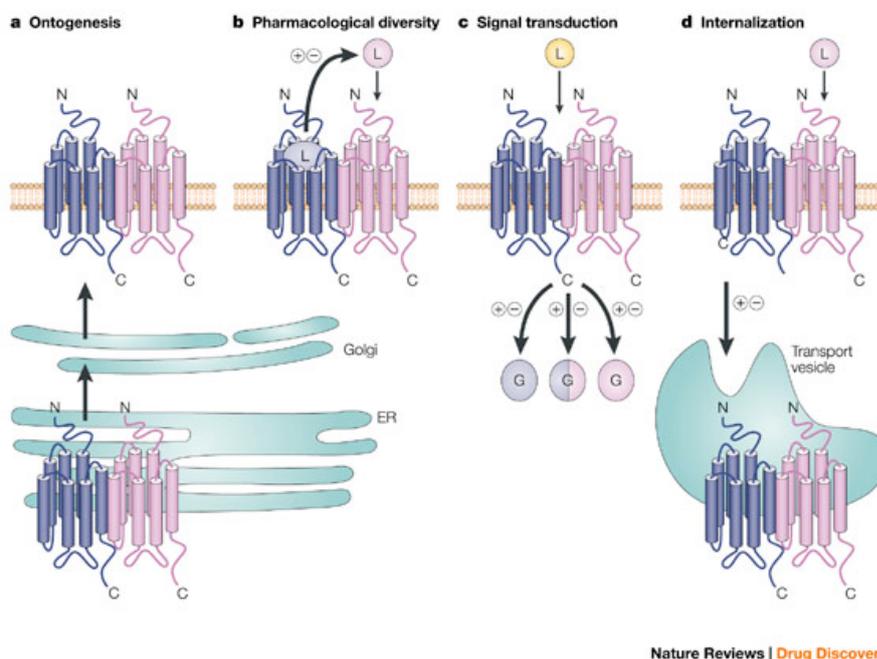


Figura 8. Aspectes funcionals relacionats amb l'heterodimerització dels GPCR. *Extret de Ellis et al., 2004.*

El paper de l'oligomerització com a element precoç en la maduració i el transport dels receptors s'ha demostrat clarament mitjançant l'observació que l'expressió de formes truncades dels receptors de vasopressina V₂ i de quimiocina CCR5 provoca la retenció intracel·lular dels homodímers corresponents, causant diabetis nefrogènica insípida i una lenta aparició dels efectes del SIDA, respectivament (Benkirane et al., 1997; Zhu i Wess, 1998).

En aquest mateix sentit cal mencionar que l'oligomerització també pot modular les propietats del tràfic dels GPCR mitjançades per l'agonista. Aquest és el cas dels heterodímers dels receptors de somatostatina SSTR₁ i SSTR₅, en el qual la internalització de l'heterodímer ocorre a pesar de la resistència a la internalització que presenta el monòmer SSTR₁ (Rocheville et al., 2000).

Existeixen evidències que indiquen que, en un gran nombre de casos, la biogènesi dels dímers o oligòmers de la família A dels GPCR es dona durant la biosíntesi del receptor i el processament al RE i Golgi. Això podria tenir un paper important en el control de la qualitat dels receptors un cop sintetitzats (Herrick-Davis et al., 2006). Quan els receptors es troben a la membrana plasmàtica, tant consideracions teòriques com experimentals, suggereixen que l'estat dimèric dels GPCR constitueix la unitat funcional bàsica del receptor, que s'acobla a la proteïna heterotrimèrica G i exhibeix característiques funcionals i/o farmacològiques que difereixen de les dels monòmers que el constitueixen (Bulenger et al., 2005).

Els estudis d'unió a lligands han donat algunes pistes de la rellevància fisiològica dels oligòmers de GPCR, ja que la formació d'aquests complexos pot resultar en la generació de llocs d'unió a lligands amb noves propietats. El primer oligòmer descrit amb diferents propietats d'unió respecte als receptors constituents va ser l'heterodímer format per receptors κ - i δ -opioides (Jordan i Devi, 1999). Aquest heterodímer no presenta alta afinitat per a la unió de lligands selectius dels receptors κ - i δ -opioides, però sí que presenta alta afinitat per als lligands selectius parcials. Els receptors que formen l'heterodímer μ - δ -opioide també presenten propietats funcionals pròpies, ja que el tractament amb un agonista específic d'un dels receptors del dímer provoca un increment tant en la potència com en l'eficàcia de l'altre receptor del dímer, mentre que el tractament conjunt amb agonistes d'ambdós receptors dona lloc a una potenciació sinèrgica del senyal mitjançat per l'heteròmer (Gomes et al., 2000).

Una de les primeres evidències destacables de que els dímers formen una unitat complexa de senyalització prové dels estudis que mostren que la disrupció de l'homodímer de receptors β_2 -adrenèrgics amb un pèptid derivat del sisè domini transmembrana, implicat en la dimerització, inhibeix la producció de AMPc induïda per agonista (Hebert et al., 1996). Aquests resultats indiquen que el dímer és l'espècie activa del receptor, encara que tampoc es pugui descartar que el pèptid estigui modificant interaccions intramoleculares dins del monòmer que provoquin la falta de funcionalitat, essent la pèrdua de la unitat dimèrica més una conseqüència que una causa de la manca de senyalització. En el mateix sentit, AbdAlla descriu que l'heteromerització entre els receptors A_{T1} i B_2 de bradicinina millora la senyalització de A_{T1} mentre que empitjora la de B_2 (AbdAlla et al., 2000).

Un altre cas interessant és el dels receptors d'adenosina i de dopamina, entre els quals s'ha descrit una cooperativitat negativa. Els agonistes del receptor A_1 d'adenosina indueixen la desaparició de l'estat d'alta afinitat del receptor D_1 de dopamina en preparacions de membrana que contenen tots dos receptors (Ginés et al., 2000) i l'estimulació del receptor A_{2A} d'adenosina redueix l'afinitat dels agonistes pel receptor D_2 de dopamina (Ferré et al., 1991). Un altre cas d'especial interès és l'heterodímer format pels receptors A_1 i A_{2A} d'adenosina en el que l'estimulació del receptor A_{2A} disminueix l'afinitat dels receptors A_1 pel seu antagonista i inhibeix la senyalització (Ciruela et al., 2006). Tenint en compte que l'afinitat per l'adenosina del receptor A_1 és més gran que la que mostra el receptor A_{2A} en aquest heteròmer, quan la concentració d'adenosina és baixa, aquest neuromodulador s'uneix al receptor A_1 inhibint l'alliberament de glutamat a l'estriat. En canvi, quan la concentració és elevada, per exemple en casos d'hipòxia, l'adenosina s'uneix també al receptor A_{2A} provocant en l'heteròmer una inhibició farmacològica i funcional del receptor A_1 . En aquestes condicions, l'adenosina estimula l'alliberament de glutamat i l'heteròmer actua com un interruptor mitjançant el qual, segons la concentració d'adenosina al medi, estimula o inhibeix la secreció de glutamat a l'estriat (Ciruela et al., 2006).

L'any 2004 es va demostrar que els receptors de dopamina D_1 i D_2 podien formar heteròmers ens cèl·lules transfectades (Lee et al., 2004). Els receptors D_1 estan acoblats a una proteïna G_s mentre que els D_2 estan acoblats a una proteïna G_i . Amb tot, quan ambdós receptors formen un heteròmer s'acoblen a una proteïna G diferent, la $G_{q/11}$. I de fet, quan la dopamina activa els receptors en l'heteròmer no dóna lloc a la senyalització via PKA i AMPc sinó que mobilitza calci i activa la calmodulina cinasa (Rashid et al., 2007). Finalment, al nostre grup s'ha descrit l'heteromerització dels receptors A_{2A} i CB_1 , i que és necessària l'activació del receptor A_{2A} per a què el receptor CB_1 inhibeixi la producció de AMPc en l'heteròmer (Carriba et al., 2007).

Actualment es creu que l'organització física dels GPCR i de les proteïnes G associades seguiria un model en el qual una sola proteïna G interactua amb un receptor en un dímer (Baneres i Parelló, 2003; Filipek et al., 2004; Fotiadis et al., 2004). Estudis recents amb el receptor de glutamat van demostrar que només una subunitat del receptor per cada dímer pot estar en estat actiu complet en un determinat moment (Goudet et al., 2005; Hlavackova et al., 2005), i s'ha arribat a proposar que la proteïna G sigui la responsable d'aquest comportament asimètric. La primera demostració experimental d'aquesta proposta va ser amb el dímer de receptor de leucotriè BLT1 (Damián et al., 2006).

3. Receptors de dopamina i d'adenosina.

3.1 Receptors de dopamina.

La dopamina (DA) és la principal catecolamina que actua com a neurotransmissor al cervell. Tal com passa amb altres neurotransmissors és incapaç de creuar la barrera hematoencefàlica i per tant se sintetitza, a partir dels seus precursors –principalment fenilalanina i tirosina–, al citosol dels terminals nerviosos. Una pujada de calci intracel·lular al citosol (via canals de calci dependents de voltatge) promou la fusió de vesícules que contenen la dopamina amb la membrana sinàptica i el conseqüent alliberament de dopamina a l'espai sinàptic. La dopamina, per difusió, arriba als receptors localitzats tant presinàpticament com postsinàpticament i el resultat final és una activació o inhibició de la neurona postsinàptica depenent del tipus de receptors present a la sinapsi. Finalment l'acció dopaminèrgica acaba amb l'eliminació de la dopamina de l'espai extracel·lular, aquest procés es duu a terme per dos mecanismes: la catàlisi mitjançant enzims extracel·lulars o la recaptació per part dels propis terminals sinàptics per mitjà de transportadors específics DAT (*dopamine transporters*) Un cop a l'interior cel·lular, la dopamina pot ser emmagatzemada i reutilitzada (Missale et al., 1998; Adell i Artigas, 2004; Sotnikova et al., 2006).

3.1.1 Estructura i classificació dels receptors de dopamina.

L'any 1978, en base a evidències bioquímiques i farmacològiques, els receptors de dopamina es van classificar en dues poblacions: una que activava l'adenilat ciclasa (AC) i una altra que inhibia la producció d'AMPc (Spano et al., 1978). L'any següent Keibabian i Calne van anomenar els receptors que activaven l'AC D_1 i els que no estaven acoblats a aquest segon missatger D_2 (Keibabian i Calne, 1979). Posteriorment s'han trobat i aïllat 5 tipus diferents de receptors de dopamina, que s'han classificat segons la vella nomenclatura en dues famílies: la *D₁-like*, que inclou els receptors D_1 i D_5 , i la *D₂-like* que comprèn els D_2 , D_3 i D_4 . Els receptors *D₁-like* estan acoblats positivament a l'AC mitjançant una proteïna G_s , mentre que els receptors *D₂-like* inhibeixen l'AC i activen canals de potassi, acoblant-se a una proteïna $G_{i/o}$ (Dal Toso et al., 1989; Sunahara et al., 1990; Civetti et al., 1993).

L'organització genòmica dels receptors de dopamina recolza el concepte que provinguin de la divergència de dues famílies gèniques, que difereixen

principalment en la presència o l'absència d'introns en les seves seqüències codificadores. Els receptors D_1 i D_5 no contenen introns a llurs regions codificadores (Gingrich, 1993). En canvi, els receptors de la família D_2 -like estan interromputs per introns: el receptors D_2 conté 6 introns (Giros et al., 1989), el receptor D_3 no té el quart intró del D_2 , i al receptor D_4 li manquen el tercer i el quart (Bunzow et al., 1988). La presència d'introns a la família D_2 -like permet la generació de diferents variants d'empalmament (*splicing*), i en efecte, el receptor D_2 es presenta en dues variants principals: el D_{2S} (curt; *short*) i el D_{2L} (llarg; *long*) que es generen per tall i unió alternatiu d'un exó de 87 parells de bases entre els introns 4 i 5.

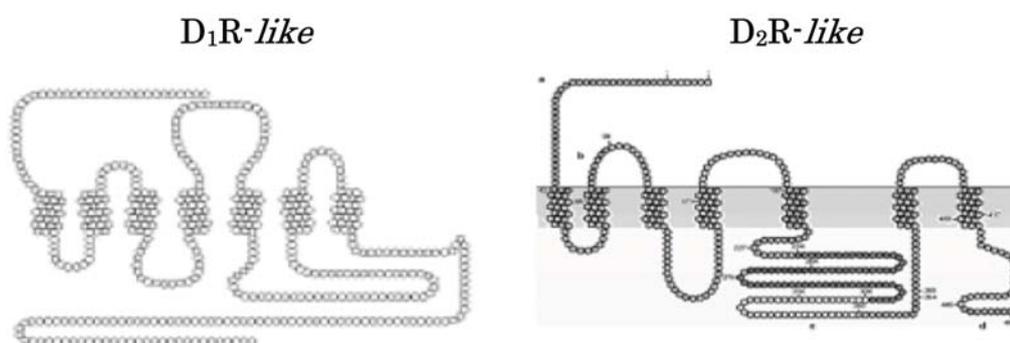


Figura 9. Representació esquemàtica de l'estructura de les famílies de receptors D_1 -like i D_2 -like.

Tots els receptors de dopamina tenen diversos residus conservats en els seus dominis transmembrana que són considerats els requeriments mínims per a la unió de catecolamines. Dues serines del cinquè TMD es creu que estan involucrades en el reconeixement dels dos grups hidroxil de les catecolamines i el residu d'àcid aspàrtic situat al tercer TMD actua com a contraió del grup amino de les amines biogèniques (Hibert et al., 1991). Els diferents subtipus de receptors sofreixen diferents modificacions post-traduccionals: els receptors D_1 -like tenen dos llocs consens per a possibles N-glicosilacions (al domini N-terminal i al segon ECL), a la família D_2 -like, els receptors D_2 i D_3 tenen quatre potencials llocs de glicosilació als ECL, mentre que el receptor D_4 només en té un. El domini C-terminal intracel·lular conté llocs de fosforilació i palmitoilació en ambdues famílies, que es pensa estan involucrats, respectivament, en la desensibilització per agonista i en la formació d'un quart bucle intracel·lular que participaria en la unió a la proteïna G.

Per a l'estudi de les propietats farmacològiques i el potencial ús terapèutic dels receptors de dopamina es disposa de diverses famílies de lligands que són capaços de diferenciar de manera més o menys específica entre els tipus *D₁-like* i *D₂-like*, malgrat això és més complicat trobar lligands selectius per als membres de cada família. Els receptors *D₁* i *D₅* tenen una alta homologia en els dominis transmembrana i per tant mostren unes propietats farmacològiques molt similars: una alta afinitat per les benzazepines (SCH 23390 i SKF 38393) i baixa afinitat per les butirofenones (espiperona o haloperidol) i les benzamides substituïdes (sulpiride). No obstant això presenten diferent afinitat per a la dopamina (s'ha descrit que la dopamina mostra una afinitat per al receptor *D₅* humà 10 cops millor que per al *D₁* humà; Figura 10).

	D ₁ -Like		D ₂ -Like		
	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
<i>Antagonists</i>					
(+)-Butaclamol	+++	++	+++	ND	++
Chlorpromazine	+	+	+++	++	++
Clozapine	+	+	+	+	++
Eticlopride	-	-	++++	ND	+++
Haloperidol	+	+	++++	++	+++
Nafadotride	ND	ND	+++	++++	+/-
Nemonapride	ND	ND	++++	++++	++++
Raclopride	-	ND	+++	+++	+/-
SCH-23390	++++	++++	+/-	+/-	+/-
(-)-Sulpiride	-	-	++	++	++
Spiperone	+	+/-	++++	+++	++++
<i>Agonists</i>					
Apomorphine	+/-	+	+++	++	+++
Bromocriptine	+	+	+++	+++	+
Dopamine	+/-	+	+	++	++
Fenoldopam	+++	+++	++	ND	+
7-OH-DPAT	+/-	ND	++	+++	+/-
Quinpirole	-	ND	+/-	++	++
SKF-38393	+++	++++	+	+/-	+/-

Figura 10. Afinitats de diferents agonistes i antagonistes per als receptors de dopamina. +++++, Constant d'inhibició (K_i) <0.5 nM; +++, 0.5 nM < K_i < 5 nM; ++, 5 nM < K_i < 50 nM; +, 50 nM < K_i < 500 nM; +/-, 500 nM < K_i < 5 μ M; -, K_i >5 μ M. *Extret de Missale et al., 1998.*

En el cas de la família *D₂-like* els perfils farmacològics no són tan homogenis. Tal com s'observa a la Figura 9 les afinitats per diversos agonistes i antagonistes varien d'un a dos ordres de magnitud entre subtipus. Tot i així, encara es conserven alguns trets comuns en tota la família *D₂-like* com són l'alta afinitat per les butirofenones i la baixa afinitat per les benzazepines. Dels receptors de

la família D₂-like, el més diferent pel que fa a la unió de lligands és el D₄: mentre que D₂ i D₃ tenen relativament alta afinitat per una benzamida com el raclopride, el D₄ no. En canvi, aquest mostra una alta afinitat pel neuroleptic atípic clozapina.

La diferent afinitat dels receptors de dopamina per al seu lligand endogen pot permetre l'activació d'uns receptors o altres en funció de la concentració de dopamina alliberada, i així, amb les diferents vies de senyalització a què s'acoba cada receptor es genera una gran diversitat de respostes a una mateixa substància. És un reflex més de la gran diversitat funcional que exerceix aquest neurotransmissor tenint en compte l'expressió diferencial dels receptors de dopamina al SNC.

L'expressió dels diferents tipus de receptors de dopamina al SNC es pot determinar mitjançant tècniques d'unió de radiolligands i d'hibridació *in situ*. De tots els receptors dopaminèrgics, el D₁ és el més abundant i el que presenta una distribució més àmplia (Dearry et al., 1990). Es troba en diferents regions del cervell com ara l'estriat dorsal, el nucli accumbens, el bulb olfatori, l'hipotàlem i el cerebel. Cal remarcar que a l'estriat, es troba de manera preferent a les neurones GABAèrgiques que expressen la substància P (Gerfen et al., 1990). El receptor D₅, en canvi, presenta una distribució molt més restringida i es troba a zones com el tàlem o l'hipocamp (Vallone et al., 2000; Centonze et al., 2003).

El receptor D₂ s'expressa principalment a l'estriat, bulb olfatori i hipocamp. N'és especialment destacable l'expressió a l'estriat, concretament a les neurones GABAèrgiques estriatopal·lidals, on no coexpressa amb el receptor D₁. S'expressa tant postsinàpticament (isoforma D_{2L}) com de manera presinàptica (isoforma D_{2S}), on actua com a autoreceptor als terminals dopaminèrgics, regulant la síntesi i l'alliberament de dopamina (Mercuri et al, 1997). El receptor D₃ s'expressa principalment a la zona límbica del nucli accumbens, de manera postsinàptica, en neurones que expressen la substància P i neurotensina. I per últim, el D₄ s'expressa en interneurones GABAèrgiques tant piramidals com no piramidals del còrtex frontal, hipocamp i al bulb olfatori, amígdala i mesencèfal (Missale et al., 1998).

3.1.2 Circuits dopaminèrgics i ganglis basals.

Encara que les neurones que usen la dopamina com a neurotransmissor siguin poques, juguen un paper molt important en la regulació del moviment, la conducta i l'alliberament d'hormones (Dale, 2000). Els circuits dopaminèrgics es poden dividir en nigro-estriatal, mesolímbic-mesocortical i tuberoinfundibular, tal com es mostra a la figura 11. Alteracions en aquestes vies de transmissió s'han associat a diverses malalties. Així en la malaltia de Parkinson trobem alterada la via negroestriatal, l'esquizofrènia s'associa amb alteracions de les vies mesolímbica i mesocortical així com diverses alteracions hormonals (com la hiperprolactinèmia, que pot provocar interrupcions del cicle menstrual, entre d'altres) amb la tuberoinfundibular (Dale, 2000).

El sistema negroestriatal s'origina a la substància negra (SN) que és un nucli d'hormones localitzat al mesencèfal i dividit en dues parts: la compacta (SN_C) formada per neurones dopaminèrgiques i la reticulada (SN_R) formada principalment per neurones GABAèrgiques. Les neurones dopaminèrgiques amb origen a la SN_C constitueixen el principal conducte dopaminèrgic del cervell i els seus axons projecten una densa innervació als nuclis caudat i putamen de l'estriat; és així que gairebé un 80% de la dopamina del cervell es troba a l'estriat. Aquest sistema està implicat en la regulació motora i l'execució de tasques, permetent que el moviment es realitzi de forma harmoniosa i que obeeixi a les ordres voluntàries de l'individu d'acord amb els patrons motors establerts (Flórez i Pazos, 2003). La malaltia de Parkinson es manifesta quan hi ha una pèrdua del 80% de les neurones dopaminèrgiques de la via negroestriatal i dona lloc a clares anormalitats motores. També es veu alterada, en menor mesura, la innervació dopaminèrgica cap a regions límbiques i corticals (Elsworth i Roth, 1997).

Els sistemes mesocortical i mesolímbic tenen l'origen a l'àrea tegmental ventral (VTA) formada per neurones dopaminèrgiques que envien les seves projeccions al còrtex frontal o al lòbul límbic, conformant els circuits mesocortical i mesolímbic, respectivament. El sistema mesolímbic es distribueix per tot el sistema límbic a excepció de l'hipocamp, i es tracta principalment de nucli accumbens (NAc), bulb olfactori, nucli central de l'amígdala, septe lateral i nucli intersticial del l'estriat terminal (Flórez i Pazos, 2003). El sistema mesocortical es projecta des de la SN_C i la VTA cap a les principals àrees motores i d'associació: els còrtex motor, premotor i suplementari i el còrtex parietal, temporal i la circumvolució del cíngol posterior. Ambdós sistemes

contribueixen a mantenir l'atenció, la ideació, l'avaluació correcta de la realitat, la motivació i el control del pensament (Flórez i Pazos, 2003). És a dir, aquells processos en que la motivació forma part essencial de la conducta ja sigui de forma fisiològica, per atendre les necessitats essencials de l'individu, o patològica, amb una hiperestimulació del sistema, fet que ocorre en processos d'addicció a drogues d'abús. Els mecanismes implicats en aquests processos s'anomenen sistemes de premi o recompensa ja que a l'activar-se aquests circuits produeixen una sensació de plaer (Wise, 1996). La majoria de substàncies que provoquen addicció interaccionen d'alguna forma amb les proteïnes de les neurones dopaminèrgiques d'aquesta via provocant un augment de la concentració de dopamina a l'espai extracel·lular. La contínua administració d'aquestes substàncies produeix una activació constant de la via aconseguint sensacions positives però perdent la sensibilitat als estímuls habituals. Quan se n'interromp l'administració apareixen sensacions desagradables, depressió o falta de motivació (Noble et al., 1994).

Els sistemes mesolímbic i mesocortical també semblen jugar un paper important en el desenvolupament de l'esquizofrènia. Hi té una especial rellevància el nucli accumbens ja que la falta de regulació en provocaria una descoordinació que sobreestimularia certes regions implicades en el processament de la informació dels sentits, contribuint als símptomes "positius" de l'esquizofrènia (al·lucinacions, deliris, pensaments incoherents...). D'altra banda, atès que les vies mesocorticals juguen un paper important al sistema cognitiu del còrtex prefrontal, les alteracions en aquesta via conduirien als efectes "negatius" de l'esquizofrènia (aïllament social, falta d'iniciativa; Pani, 2002; Abi-Dargham 2004).

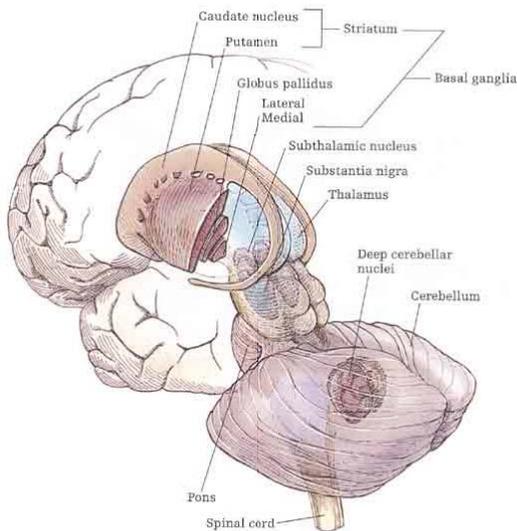
La dopamina també es troba involucrada en el sistema tuberohipofisari. Aquest s'origina a l'hipotàlem i es projecta cap a la hipòfisi i les seves neurones juguen un paper important en la regulació de l'alliberament d'hormones pituitàries, especialment la prolactina. En aquest aspecte la dopamina té un efecte inhibidor de l'alliberament de prolactina (Dale, 2000).

En les situacions patològiques que s'han comentat s'han observat alteracions en la quantitat o la funció dels receptors de dopamina. Així els receptors D₁ es veuen sobreexpressats en l'esquizofrènia i alterada la seva senyalització en Parkinson. La densitat de receptors D₂ augmenta postsinàpticament en l'esquizofrènia i en malalts de Parkinson no tractats amb L-dopa. Per tant, els

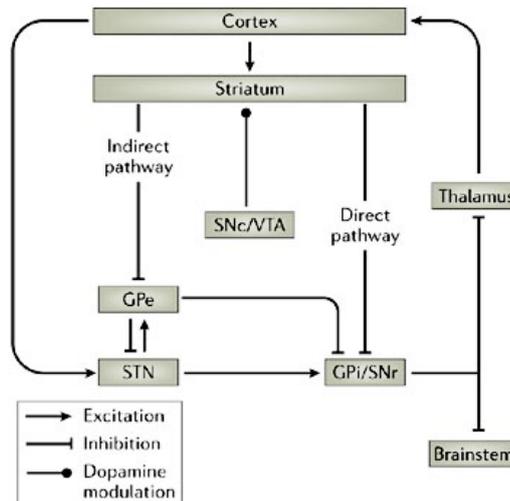
receptors dopaminèrgics han esdevingut dianes importants en el tractament d'aquestes patologies.

Els ganglis basals estan constituïts per un conjunt de nuclis heteròlegs que formen una unitat integradora funcional, se situen a la base del cervell i estan connectats al còrtex, al tàlem i a altres àrees cerebrals. El seu paper fonamental és integrar la informació senso-motora, associativa i límbica i permetre comportaments motors. En humans, els ganglis basals els formen cinc nuclis principals: l'estriat (o neoestriat en rosegadors), la substància negra, el *globus pallidus* intern (GP_i), el pàl·lid extern (GP_e, o nucli entopeduncular en rosegadors) i el nucli subtalàmic (STN) (Figura 11A).

A



B



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Neuroscience

Figura 11. Localització dels ganglis basals al cervell i representació esquemàtica de les vies dopaminèrgiques. Extret de Yin i Knowlton, 2006.

L'estriat és la principal estructura d'entrada als ganglis basals i està funcionalment dividit en estriat dorsal i ventral. L'estriat dorsal (nuclis caudat i putamen) està implicat en l'execució i aprenentatge d'actes motors complexos. En canvi, l'estriat ventral (nucli accumbens) forma part dels circuits implicats en la conversió de la motivació a l'acció. La població majoritària a l'estriat (més del 90%) són neurones GABAèrgiques de caràcter inhibitor (també anomenades *medium-size spiny neurons*). Aquestes neurones reben dues vies d'entrada que convergeixen a les espines dendrítiques: d'una banda, les

projeccions dopaminèrgiques provinents del mesencèfal (SN_c i VTA) i d'altra les neurones glutamatèrgiques provinents d'àrees corticals, límbiques i talàmiques (hipocamp i amígdala) (Gerfen, 2004).

Hi ha dos subtipus de neurones GABAèrgiques eferents a l'estriat, que projecten al tàlem a través de dues vies: la via indirecta (neurones estriatopal·lidals) o la via directa (neurones estriatonegroentopedunculars). Els dos tipus de neurones es distingeixen neuroanatòmicament ja que les de la via indirecta (estriatopal·lidals) contenen el pèptid encefalina i el receptor D₂ de dopamina, i les de la via directa que contenen dinorfina, la substància P i el receptor D₁ de dopamina. Les neurones de la via directa projecten els seus axons cap al GP_i i la SN_R, inhibint-los. El complex format per GP_i i SN_R actua inhibint el tàlem, així que l'excitació de les neurones de la via directa resulta finalment en una activació del tàlem, i aquest projecta els seus axons glutamatèrgics excitadors cap al còrtex motor, estimulants el moviment. La via indirecta projecta els seus axons inhibidors cap al GP_e, que inhibeix tònicament el STN, resultant en una reducció de la inhibició del STN. El STN projecta els seus terminals glutamatèrgics cap al GP_i i la SN_R i per tant, la seva activació dóna com a resultat l'activació d'aquest complex, que com s'ha dit anteriorment actua inhibint el tàlem. El resultat final de l'estimulació de la via indirecta és doncs una reducció de l'estimulació del còrtex motor, i per tant actua contrarestant la via directa. (Figura 11B; Yin i Knowlton, 2006).

Així doncs, l'activació de la via directa dóna lloc a una estimulació motora mentre que la de la via indirecta produeix una inhibició motora. Les projeccions dopaminèrgiques provinents de la SN_c modulen aquestes vies. La dopamina, o els seus agonistes, induiran una activació motora activant la via directa – mitjançant els receptors estimuladors D₁- i inhibint la via indirecta –actuant sobre els receptors inhibitoris D₂ (Figura 11B; Alexander i Crutcher, 1990).

3.1.3 La malaltia de Parkinson i els models animals pel seu estudi.

La malaltia de Parkinson (*Parkinson's disease*, PD) va ser descrita per primera vegada l'any 1817 per James Parkinson. És la segona malaltia neurodegenerativa més comuna amb una prevalença estimada del 1 al 2% en la població de més de 65 anys (de Rijk et al., 2000). Els símptomes que presenta habitualment la PD són bradicinèsia (alenteïment dels moviments), tremolor, rigidesa i reflexos posturals anormals. Quan es presenten aquests símptomes,

una gran proporció (del 50 al 70%) de les neurones dopaminèrgiques de la SN part compacta s'han perdut, resultant en una reducció de la síntesi i l'alliberament de dopamina als terminals de l'estriat. El distintiu patològic de la PD és la formació de cossos de Lewy (*Lewy bodies*, LB) en les neurones dopaminèrgiques que sobreviuen. Els LB són inclusions intracitoplasmàtiques eosinòfiles compostes predominantment per ubiquitina, α -sinucleïna, més recentment descobert, i parkina (Spillantini et al., 1997; Schlossmacher et al., 2002).

Els principals receptors involucrats en la malaltia de Parkinson són els receptors D_1 i D_2 de dopamina, localitzats majoritàriament a l'estriat cerebral (Foley et al., 2004). Els dèficits motors que es generen progressivament en la PD estan causats essencialment per la progressiva degeneració de la via negroestriatal, i per tant, per la creixent reducció en l'activació dels receptors D_1 i D_2 de l'estriat. Una disminució de l'alliberament de dopamina a l'estriat provoca una hipoactivitat de les neurones de la via directa i una hiperactivitat de les neurones estriatopallidals de la via indirecta amb el conseqüent descontrol de l'activitat dels ganglis basals (Obeso et al., 2008) A més, altres estructures com el nucli pedunculo pontí (PPN) reben estímuls anormals dels ganglis basals i contribueixen a altres símptomes com el trastorn de la marxa (Figura 12).

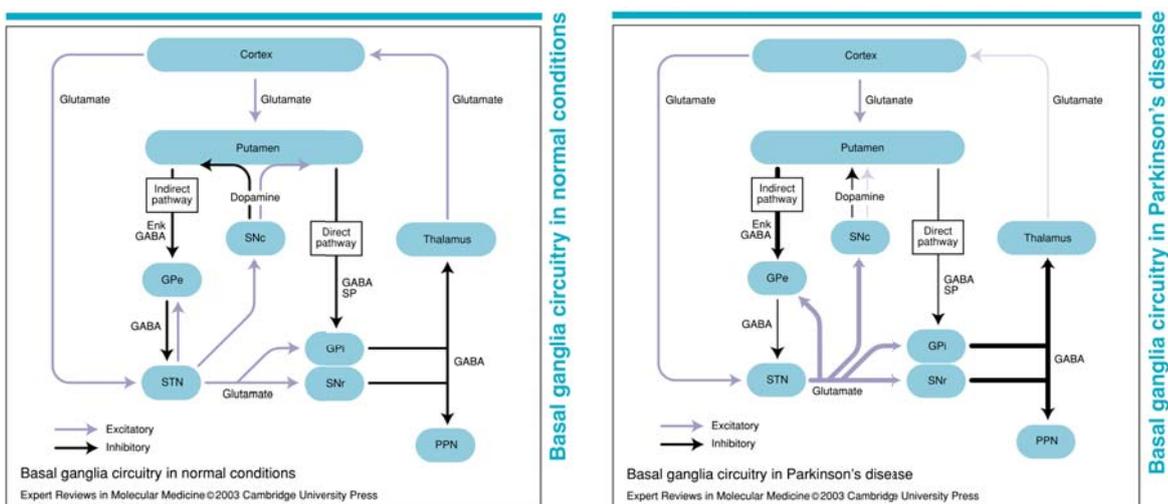


Figura 12. Alteració dels circuits neuronals als ganglis basals. En una situació de PD el balanç natural (esquerra) es perd a causa d'una depleció de dopamina a l'estriat. El resultat està representat com una alteració de la grossor de les fletxes (dreta), i globalment dóna lloc a una disminució de l'activitat motora, tal com es descriu detalladament al text. *Adaptat de Lewis et al., 2003.*

El factor que més fortament es relaciona amb l'establiment de la PD és l'edat o l'envelliment. Malgrat això, se sap poc de com el procés d'envelliment hi està involucrat (Hindle et al., 2010). L'explicació habitual és la major vulnerabilitat de les neurones dopaminèrgiques a causa de la fallada fisiològica i bioquímica dels processos cel·lulars normals. En l'etiologia de la PD també hi ha un element genètic significant, almenys en una part dels pacients, en els que s'han identificat mutacions en diferents gens en el que s'han anomenat casos de PD familiar (Tanner et al., 1999; Piccini et al., 1999; Sveinbjornsdottir et al., 2000; Gasser, 2008; Kitada et al., 1998; Kruger et al., 1998; Leroy et al., 1998; Bonifati et al., 2002). Per altra banda toxines ambientals també s'han associat amb el parkinsonisme, entre elles el monòxid de carboni, el manganès i de manera més important la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP; Lagnston i Ballard, 1983). De tota manera les síndromes clínica i patològica associades a casos familiars i als causats per agents ambientals són molt similars i això fa pensar que la PD és una malaltia heterogènia probablement causada per més d'un factor etiològic específic (Orth et al., 2003).

A mesura que avança el procés degeneratiu es fa necessària una teràpia de reposició de la dopamina per tal de pal·liar la disfunció motora. Quatre dècades després de la seva introducció, la levodopa (L-DOPA) és encara l'agent més efectiu per alleujar els símptomes motors del PD (Encarnacion i Hauser, 2008), però el seu ús crònic està associat amb el sorgiment d'altres complicacions motores que inclouen fluctuacions de resposta i discinèsia. Encara que els mecanismes que donen lloc a aquests complicacions motores no estan del tot entesos, la idea general és que l'estimulació polsàtil no fisiològica de les neurones estriatals contribueix al trastorn de l'homeòstasi dels ganglis basals.

La discinèsia induïda per L-dopa (*Levodopa induced dyskinesia*; LID) és el resultat dels efectes combinats de la degradació de les neurones dopaminèrgiques nigroestriatals i del tractament polsàtil amb L-dopa. La lesió dopaminèrgica nigroestriatal predispesa a la LID de dues maneres: primer, l'enerveció dopaminèrgica desplaça les rutes de captació i conversió de la L-dopa al cervell des de les neurones nigroestriatals a altres llocs no fisiològics. Això resulta en un alliberament de dopamina exògena no regulat i una depuració defectuosa d'aquesta. En aquesta situació, els règims habituals de tractament amb L-dopa van acompanyats de llargues i intermitents fluctuacions de dopamina extracel·lular al cervell. En segon lloc, l'enerveció dopaminèrgica comporta una supersensibilització dels receptors dopaminèrgics postsinàptics (Gerfen et al., 2002; Aubert et al., 2005) que genera respostes exuberants a cada

dosi de fàrmac. El tractament pulsàtil amb L-DOPA encara exagera més la supersensibilitat dels receptors D_1 de dopamina i és causa de canvis en l'expressió de gens i proteïnes estriatals que estableixen i mantenen un estat propens a la discinèsia.

Un punt important en el desenvolupament de la teràpia antiparkinsoniana és l'evidència de la presència d'interaccions antagòniques entre els receptors A_{2A} d'adenosina i D_2 de dopamina. En base a aquestes interaccions van portar a proposar els antagonistes d' A_{2A} com una nova teràpia per a la PD (Ferré et al., 1991; Ferré i Fuxe, 2002). Els antagonistes del receptor A_{2A} podrien reduir la inhibició tònica que l'adenosina exerceix sobre els receptors D_2 activats per L-DOPA, i per tant es creu que podrien tenir un potencial terapèutic significatiu perquè permetrien rebaixar les dosis de L-DOPA (Schwarzchild et al., 2006).

El desenvolupament de models animals és essencial per entendre millor la malaltia de Parkinson i provar els agents terapèutics per al tractament dels pacients. Un model hauria de reproduir les característiques clíniques i patològiques de la malaltia, incloent-hi una pèrdua crònica i progressiva de les neurones dopaminèrgiques, un desordre motor que respongui al tractament amb L-DOPA i l'aparició de cossos de Lewy. Malauradament, avui en dia encara no hi ha cap model animal que sigui una fenocòpia exacta de la malaltia de Parkinson. Els primers models van ser desenvolupats amb neurotoxines específiques, agents que selectivament anul·laven o destrossaven els sistemes catecolaminèrgics, com la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o el MPTP (Dauer i Przedborski, 2003). Més recentment s'ha descobert que altres productes químics usats en l'agricultura (la rotenona, el maneb o el paraquat) podien induir característiques similars al parkinsonisme quan eren administrats de forma sistèmica (Betarbet et al., 2000; 2002). En qualsevol cas, una característica comuna a totes aquestes neurotoxines és que totes afecten als complexos mitocondrials I o III (Figura 13; Schober, 2004).

La 6-hidroxidopamina és una de les neurotoxines més emprades en models de degeneració de les projeccions catecolaminèrgiques centrals, incloent-hi el sistema negroestriatal (Ungerstedt, 1968; Sachs i Jonsson, 1975; Blum et al., 2001). La 6-OHDA és un anàleg hidroxilat de la dopamina que va ser aïllat per primer cop l'any 1959 per Senoh i Witknop. Aquesta molècula indueix una toxicitat relativament selectiva per les neurones catecolaminèrgiques com a resultat de l'absorció de 6-OHDA per transportadors noradrenèrgics i de

dopamina (per exemple el DAT; Luthman et al. 1989). Dins les neurones, la 6-OHDA s'acumula al citosol i als mitocondris, i indueix una mort cel·lular sense apoptosi (Jeon et al., 1995), causada per una inhibició de la cadena respiratòria i l'estrès oxidatiu que genera la formació d'espècies reactives. Ambdós mecanismes no tenen perquè estar vinculats, però actuen en sinergia durant la degeneració neuronal (Figura 13).

La 6-OHDA administrada de manera sistèmica no pot creuar la barrera hematoencefàlica, per tant ha de ser injectada estereotàcticament al cervell. Els llocs d'injecció preferents són la SN, el fascicle prosencefàlic medial (*medial forebrain bundle*; MFB), i l'estriat cerebral (Perese et al., 1989; Przedborski et al., 1995). Quan la 6-OHDA s'injecta a la SN o al MFB les neurones dopaminèrgiques comencen a degenerar en 12 hores i 2 o 3 dies després els nivells de dopamina a l'estriat es veuen reduïts (Faul i Laverty, 1969). En canvi, la injecció a l'estriat comporta una mort neuronal més progressiva (Berger et al., 1991; Sauer i Oertel, 1994; Przedborski et al., 1995). La magnitud de la lesió depèn de la quantitat de 6-OHDA injectada, el lloc d'injecció i l'espècie utilitzada (Betarbet et al., 2002). Les lesions bilaterals amb 6-OHDA indueixen, en part, els símptomes motors parkinsonians, així i tot, no és el tipus de model que s'utilitza de manera habitual (Cenci et al., 2002). Les lesions unilaterals, en canvi, provoquen un comportament motor asimètric i quantificable quan s'indueix per l'administració sistèmica d'agonistes dopaminèrgics, L-DOPA o substàncies que provoquin l'alliberament de dopamina (amfetamines; Hefti et al., 1980). En aquest model unilateral de 6-OHDA, també conegut com a "model hemiparkinsonià" l'hemisferi que no està lesionat s'ha proposat com control intern (Perese et al., 1989).

De totes maneres, els models de 6-OHDA no mimetitzen tots els trets patològics i clínics del parkinsonisme humà: no hi ha formació de cossos de Lewy i a més la 6-OHDA no afecta a altres àrees que sí que es veuen involucrades en la PD (Betarbet et al., 2002, Del Tredici et al., 2002). A més, només s'han reportat casos de tremor parkinsonià en comptats estudis en rosegadors lesionats amb 6-OHDA, i en algun cas s'ha descrit acinèsia o rigidesa (Lindmer et al., 1999; Cenci et al., 2002). En general, aquest model només indueix efectes aguts, cosa que difereix significativament de la lenta progressió de la malaltia de Parkinson.

El MPTP és un compost altament lipofílic i que és capaç de creuar la barrera hematoencefàlica quan és administrat de manera sistèmica. Subsegüentment, la protoxina MPTP és convertida a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridoni (MPDP)

exclusivament en cèl·lules no dopaminèrgiques (especialment en astròcits i neurones serotoninèrgiques) mitjançant la monoamina oxidasa B (MAO-B). Després aquest compost s'oxida espontàniament a 1-metil-4-fenilpiridoni (MPP⁺). Aleshores el MPP⁺ s'allibera a l'espai extracel·lular per un mecanisme encara desconegut (Przedborski i Vila, 2003). La molècula polar MPP⁺ no és capaç d'entrar a les cèl·lules així que la seva absorció depèn de transportadors de membrana, com ara el DAT per al qual s'han reportat altes afinitats, però també els de noradrenalina i serotonina (Javitch i Snyder, 2003; Javitch et al., 1985; Mayer et al., 1986). Dins les neurones dopaminèrgiques el MPP⁺ es pot unir al transportador vesicular de monoamines i incorporar-se a les vesícules sinàptiques que contenen dopamina (Del Zompo et al., 1993). A més, també es pot acumular als mitocondris, on inhibeix el complex I de la cadena respiratòria (Nicklas et al., 1985; Mizuno et al., 1987) o quedar-se al citoplasma on pot interaccionar amb diversos enzims citosòlics (Ramsay i Singer, 1986; Adams et al., 1993; Klaidman et al., 1993; Figura 13).

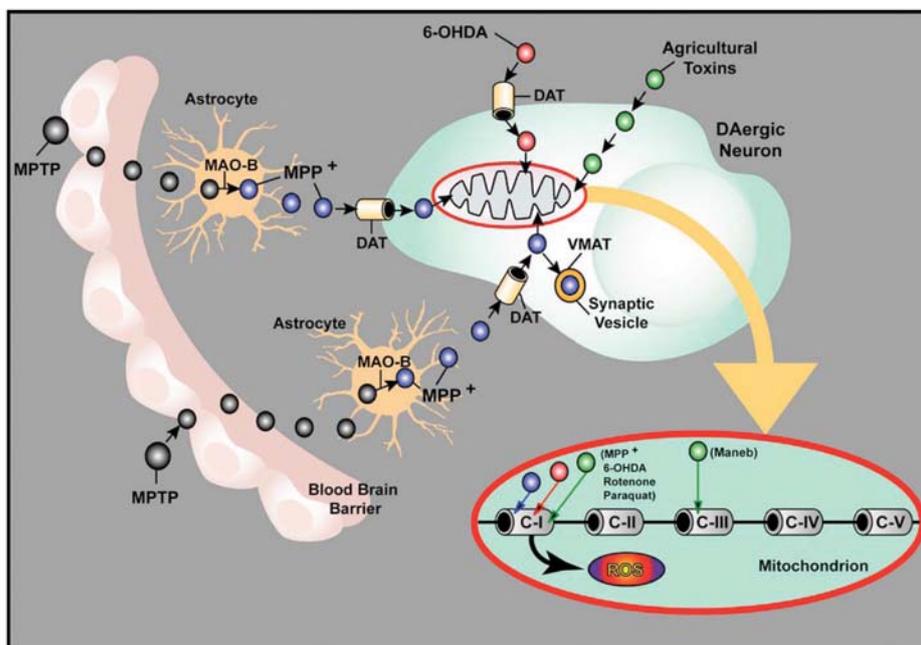


Figura 13. Mecanismes d'acció de les toxines usades per a la inducció de símptomes parkinsonians. Representació esquemàtica de com les toxines causants de la mort de les cèl·lules dopaminèrgiques exerceixen els seus mecanismes específics sobre aquestes. *Extret de Schober, 2004.*

El MPTP es fa servir principalment en primats no humans i en ratolins, però també en altres espècies com gossos, gats, ovelles, rates i carpins (Gerlach i

Riedar, 1996; Przedborski et al., 2001). Amb vista a les espècies usades, s'han establert diferents rutes d'administració de MPTP. En principi el MPTP pot ser donat en una ampla varietat de règims com l'alimentari o la injecció estereotàctica però la forma més comuna i reproduïble és l'administració sistèmica, ja sigui de manera subcutània, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular (Przedborski et al., 2001).

Les mones tractades amb MPTP sovint exhibeixen una síndrome parkinsoniana generalitzada, i l'administració de L-DOPA és necessària per permetre als animals tractats menjar i beure adequadament (Petzinger i Langston, 1998). En el passat, els primats eren exclusivament tractats amb altes dosis de MPTP per induir una degeneració severa i espontània de les neurones dopaminèrgiques. Actualment, les mones són tractades, cada cop més, amb baixes dosis de la neurotoxina durant períodes de temps prolongats, setmanes o mesos (Przedborski et al., 2001). Aquesta aproximació causa efectes de degeneració crònics i per tant, aquesta modificació imita la patogènesi del parkinsonisme humà més adequadament (Schneider i Roeltgen, 1993; Bezard et al., 1997a i b; Schneider et al., 1999).

Però d'altra banda, el model primat lesionat amb MPTP no indueix dos trets característics importants del PD: es perden neurones de manera no consistent en altres àrees monoaminèrgiques del cervell, i encara que s'han descrit inclusions intraneuronals, no s'ha demostrat de manera convincent que es formin els clàssics LB ni en pacients intoxicats ni en animals experimentals (Forno et al., 1993). Així doncs, els models tractats amb MPTP són usats per provar noves teràpies en mones, essent el model crònic el més apropiat per a provar noves estratègies neuroprotectives (Przedborski et al., 2001). De totes maneres, per culpa de les restriccions econòmiques, ètiques i logístiques relacionades amb l'experimentació amb primats, aquests models es fan servir en relativament pocs laboratoris arreu del món (Cenci et al., 2002).

Les dades obtingudes amb MPTP són controvertides. Rates en que s'han injectat dosis de MPTP comparables a les usades en mones o en ratolins no presenten cap degeneració dopaminèrgica significant (Giovanni et al., 1994a, b), i només injeccions de dosis molt més altes en causen la degeneració. Remarcablement, aquestes rates han d'estar pretractades terapèuticament per prevenir l'alliberament perifèric de catecolamines i una extensiva mortalitat (Giovanni et al., 1994a). Tot això indica que les rates són relativament insensibles a MPTP i en conclusió no es recomanen per a estudis amb MPTP perquè no desenvolupen

el parkinsonisme que presenten les mones i els ratolins (Schmidt i Ferger, 2001).

Avui en dia i a pesar de les seves limitacions, la neurotoxicitat per MPTP és el model més disponible i popular de PD (Beal, 2001; Schmidt i Ferger, 2001; Betarbet et al., 2002; Dauer i Przedborski, 2003; Hirsch et al., 2003; Orth i Tabrizi, 2003; Przedborski i Vila, 2003). Tot i així la injecció de 6-OHDA a l'estriat o la SN segueix essent usat perquè indueix dèficits motors quantificables (la rotació) com a principal avantatge respecte altres models.

3.1.4 Implicació dels receptors de dopamina en els efectes de la cocaïna.

Com s'ha comentat anteriorment, els sistemes mesocortical i mesolímbic estan implicats en aquells processos en què la motivació forma part essencial de la conducta. Una hiperestimulació del sistema és el fet que ocorre en processos d'addicció a drogues d'abús (Wise, 1996). La majoria de substàncies que provoquen addicció interaccionen d'alguna forma amb les proteïnes de les neurones dopaminèrgiques d'aquestes vies provocant un augment de la concentració de dopamina a l'espai extracel·lular. Així, la cocaïna exerceix les seves funcions per interacció específica amb diferents proteïnes. D'aquestes, la proteïna més reconeguda que pot unir cocaïna és el transportador de dopamina DAT. La interacció entre cocaïna i DAT s'ha estudiat a nivell molecular. Mitjançant el modelatge molecular de DAT, basat en l'estructura cristal·lina del transportador de leucina homòleg en *Aquifex aeolicus* (LeuT), s'ha postulat que la unió de cocaïna té lloc en un domini d'unió anàleg al lloc d'unió de la leucina a LeuT (Ravna et al., 2009). Al centre d'unió de la cocaïna amb el DAT hi intervien les hèlix transmembrana 1, 3, 6 i 8 del transportador. Així aquest centre d'unió es superposa amb el lloc d'unió de la dopamina i les amfetamines, però és clarament diferent del lloc d'unió de diferents antidepressius (Beuming et al., 2008). Aquest fet explica el bloqueig de la unió de la dopamina a DAT induït per la cocaïna, seguit de l'increment dels nivells de dopamina a l'espai extracel·lular, la qual cosa provoca una sobreestimulació de les vies dopaminèrgiques. Mitjançant la potenciació de la transmissió dopaminèrgica a l'estriat, la cocaïna indueix els efectes de recompensa així com l'aparició de nous estímuls (Volkow et al., 2003; Zink et al., 2003). Els receptors D₂ estan involucrats en la mediació d'aquests efectes. Els agonistes dels receptors D₂ redueixen l'autoadministració de cocaïna, mentre que els antagonistes

incrementen aquest comportament. Aquests resultats suggereixen que el receptor D_2 actiu per un mecanisme de *feed-back* per a disminuir l'autoadministració de cocaïna (Corrigall i Coen, 1991; Caine et al., 1999).

Mitjançant estudis *in vitro* (Bertolino et al., 2009) i *in vivo* (Dickinson et al., 1999; Meiegerd et al., 1993; Mortensen i Amara, 2003) s'ha pogut demostrar que hi ha una relació directa entre el DAT i el receptor D_2 de dopamina ja que ambdós es regulen de forma recíproca a nivell presinàptic. Bertolino i col·laboradors (2009) han demostrat que també hi ha una interacció molecular entre DAT i D_2 , la qual pot ser fonamental per entendre com la senyalització dopaminèrgica es veu clarament regulada a nivell presinàptic per DAT i D_2 a l'estriat i el còrtex prefrontal.

A part de DAT, la cocaïna també pot interaccionar amb altres proteïnes. Avui en dia ja està plenament acceptat que interacciona amb els receptors sigma (σ_1 i σ_2) a concentracions fisiològiques (Cobos et al., 2008; Hayashi i Su, 2005; Sharkley et al., 1988; Matsumoto et al., 2003). Matsumoto i col·laboradors van descriure que els antagonistes dels receptors sigma inhibeixen de forma significativa les convulsions i la letalitat induïda per dosis tòxiques de cocaïna i que la toxicitat de la cocaïna es veu potenciada pels agonistes de σ_1 (Matsumoto et al., 2002; 2004), aquests fets porten a pensar que les accions de la cocaïna poden anar mitjançades, almenys en part, pels receptors sigma. Tot i que l'estructura de σ_2 encara no es coneix, l'estructura de σ_1 està ben caracteritzada i és diferent de la de qualsevol altra proteïna coneguda en mamífers i encara que mostra un 66% d'homologia amb una esterol isomerasa fúngica, no en té l'activitat enzimàtica (Su i Hayashi, 2003). Es caracteritza però, per tenir tres regions altament hidrofòbiques que formen dos segments transmembrana, amb els extrems amino i carboxil terminals a l'espai intracel·lular (Figura 14; Su et al., 2010).

El receptor σ_1 és una xaperona que modula la senyalització dependent de calci i es localitza principalment al reticle endoplasmàtic de la cèl·lula, encara que també pot trobar-se a la membrana plasmàtica, nuclear i mitocondrial (Alonso et al., 2000). A més, es distribueix per tot el SNC i la perifèria. L'any 1976, Martin *et al.* el van classificar com a un receptor opioide, malgrat això l'acció dels lligands de σ_1 no era bloquejada pels antagonistes opioïdes, naloxona i naltrexona, i es va passar a considerar com a receptor orfe, no opioide. A més de la cocaïna, aquest receptor interacciona amb altres substàncies entre les que destaquen l'haloperidol o els esteroides com la progesterona (Hayashi et al.,

2003). Molt recentment s'ha descobert un al·lucinogen endogen que interacciona amb el receptor σ_1 , la *N,N*-dimetiltriptamina (DMT). Aquesta substància actuarà com a agonista endogen del receptor, inhibint els canals de sodi dependents de voltatge als miòcits (Fontanilla et al., 2009; Guitart et al., 2004). El receptor σ_1 també està implicat en la modulació de l'alliberament de calci, de la contracció cardíaca i la inhibició dels canals de potassi dependents de voltatge (Monassier et al., 2002). També s'ha descrit la interacció de receptor σ_1 amb els receptors de IP_3 al reticle endoplasmàtic (Hayashi et al., 2001), i recentment s'ha demostrat que l'activació del receptor σ_1 mitjançant els seus agonistes (PRE-084 o carbetapentà) fosforila la subunitat NR1 del receptor NMDA via PKC i PKA, augmentant-ne l'expressió i reforçant la inducció del dolor a través d'aquest receptor. En canvi, aquest senyal es veu reduït amb el tractament amb l'agonista del receptor σ_1 (Kim et al., 2008).

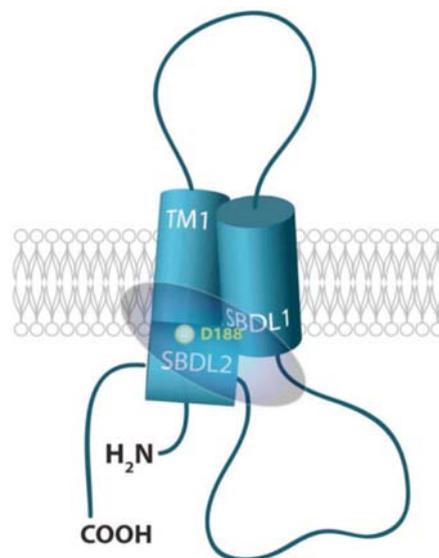


Figura 14. Model l'estructura del receptor σ_1 . Encara que l'estructura exacta encara és desconeguda es mostren les tres regions hidrofòbiques SBDL (steroid binding domain-like 1 i 2; anomenades així per homologia de seqüència amb les de la isomerasa fúngica) com a hèlix alfa. *Extret de Su et al., 2010.*

Molt recentment el nostre grup de recerca ha posat de manifest que D_1 i σ_1 podien heteromeritzar en cèl·lules transfectades, on la cocaïna potencia l'activació mitjançada per D_1 de l'adenil ciclase, indueix l'activació de les MAPK *per se* i contraresta l'activació de les MAPK induïda per estimulació del receptor D_1 de manera independent de DAT i dependent de σ_1 . Alguns d'aquests efectes també van ser demostrats en talls d'estriat de ratolí, però no es van observar en ratolins *knock-out* per σ_1 , proporcionant una evidència de l'existència dels heteròmers entre σ_1 i D_1 al cervell. Per tant, aquests resultats proporcionen una

explicació molecular per la qual els receptor D_1 interpreten un paper més significant en els efectes comportamentals de la cocaïna, a través de l'heteròmer esmentat, i introdueixen una nova perspectiva per entendre les bases moleculars de l'addicció a la cocaïna (Navarro et al., 2010).

3.2 Receptors d'adenosina.

L'adenosina és un nucleòtid endogen format per ribosa i l base purínica adenina. Tant l'adenosina com els seus derivats són constituents essencials de les cèl·lules vives i formen part de peces claus per a la formació de molècules biològiques bàsiques com els nucleòtids ATP i AMPc, els àcids nucleics, i cofactors com el NAD⁺.

En condicions normals l'adenosina es troba tant al medi intracel·lular com a l'extracel·lular, i les concentracions basals d'aquest nucleòsid en reflecteixen un equilibri entre la síntesi i la degradació. Quan la concentració extracel·lular és alta aquesta és transportada a l'interior cel·lular per transportadors específics i un cop dins la cèl·lula pot ser fosforilada a AMP per l'adenosina cinasa, o degradada a inosina per l'adenosina desaminasa (ADA). L'ADA, i no l'adenosina cinasa, també es troba a l'espai extracel·lular, establint un altre mecanisme de regulació de la concentració d'adenosina extracel·lular (Franco et al., 1998).

A més del seu rol en la regulació metabòlica, l'adenosina i els seus derivats, mitjançant la unió als receptors purinèrgics juguen un paper significatiu en diversos processos biològics en diversos teixits, entre els que destaquen el cervell i el cor (Berne et al., 1983). També juga un paper clau en el balanç energètic ja que té acció vasodilatadora i d'estimulació de la captació i l'oxidació de glucosa, així com d'inhibició de la lipòlisi (Burns et al., 1986).

3.2.1 Estructura i classificació dels receptors d'adenosina.

Els receptors purinèrgics es classifiquen en dues grans classes: els receptors P_1 (o receptors d'adenosina) i els receptors P_2 (o receptors de nucleòtids) (Fredholm et al., 1994; Sawynok et al., 2007). Els receptors P_1 són GPCR que uneixen adenosina com a lligand endogen i en base a llurs característiques moleculars, bioquímiques i farmacològiques, s'han classificat en quatre subtipus: A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 (Ribeiro et al., 2002). Les parts amb més homologia entre aquests són els dominis transmembrana, i aquestes regions conjuntament

amb el segon ECL estan implicades majoritàriament en el reconeixement i la unió de lligands (Rivkees et al., 1999). Com la majoria de GPCR presenten residus de cisteïna als ECL que ajuden a estabilitzar-ne les conformacions un cop inserits a la membrana plasmàtica, i també contenen el motiu DRY al tercer ICL que mitjança l'activació de la proteïna G. A més, com és habitual en aquests receptors, al segon ECL tenen llocs consens per a la N-glicosilació (Klotz et al., 1986). Tots els receptors d'adenosina excepte l'A_{2A} tenen un residu de cisteïna a la cua C-terminal que en permet la palmitoilació, i això fa que es pugui inserir a la membrana i en conseqüència formar un quart ICL que pot participar en l'acoblament dels receptors a la proteïna G (Bouvier et al., 1995).

Els receptors d'adenosina es van dividir inicialment en base al seu efecte sobre l'adenilat ciclase (Fredholm et al., 2001). Els receptors A₁ i A₃ estan predominantment acoblats a proteïnes del subtipus G_i (encara que també s'han descrit acoblats a G_o o G_q), mentre que els receptors A₂ s'acoblen preferentment a proteïnes del tipus G_s i a G_{olf}. Depenent de la proteïna G a la que estiguin acoblats s'estimularan diferents vies de senyalització. Els receptors A₁ estimulen l'adenilat ciclase i activen diversos tipus de canals de potassi (a través de la subunitat betagamma βγ), inactiven canals de calci (de tipus N, P i Q) i activen la fosfolipasa Cβ (PLCβ). L'activació de A_{2A} i A_{2B} estimula la producció d'AMPc (via AC) principalment, però l'A_{2B} acoblat a G_q també mitjança la mobilització de calci intracel·lular mitjançant PLC (Taula 1). A més, tots els receptors d'adenosina han mostrat un acoblament positiu a la cascada de les MAPK en diferents cèl·lules (Fredholm et al., 2001).

	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
G protein-coupling	G _{i/o}	G _s	G _s G _q	G _i G _q
Effects	↓cAMP ↑IP ₃ ↑K ⁺ ↓Ca ²⁺	↑cAMP	↑cAMP ↑IP ₃	↓cAMP ↑IP ₃
Selective agonists	CPA, CCPA, CHA, R-PIA	CGS21680, HE-NECA, APEC, CV 1808, DPMA, WRC-0470	—	IB-MECA, 2Cl-IB-MECA
Selective antagonists	DPCPX, XAC, KW-3902, ENX, KFM 19, N 0861, FK 453, WRC 0571	KF17837, ZM241385, CSC, SCH 58261	—	I-ABOPX ^{2-a} , L-268605, L-249313, MRS 1067, MRS 1097

Taula 1. Propietats farmacològiques dels receptors d'adenosina.
Extret de Ralevic i Burnstock, 1998.

Molt recentment s'ha determinat l'estructura del cristall del receptor A_{2A} humà unit a l'agonista selectiu d'alta afinitat ZM241385, amb una resolució de 2.6Å (Jaakola et al., 2008; 2010). El lligand està unit en una conformació estesa i perpendicular a la membrana, interaccionant amb els bucles extracel·lulars i les hèlix transmembrana (Figura 15). Més recentment, s'ha pogut obtenir l'estructura cristal·lina d'aquest mateix receptor unit a l'agonista UK-432097, que pot ajudar a entendre els canvis conformacionals associats a l'activació d'aquest receptor així com els seus mecanismes de senyalització (Xu et al., 2011).

L'adenosina és el lligand endogen, però té un interès limitat per a l'estudi *in vitro* dels seus receptors ja que pot ser metabolitzada per molts mecanismes. No obstant això, la molècula d'adenosina és el nucli central a partir del que han derivat els agonistes farmacològics. Hi ha tres posicions a la molècula que poden ser modificades sense que perdi l'activitat com a agonista: el carboni 5' de la ribosa i els C2 i N6 de l'adenina (Baraldi et al., 2006; Choi et al., 2009). Les metilxantines són el prototip d'antagonista per als receptors d'adenosina. Les modificacions sobre aquesta molècula donen lloc a una gran quantitat de derivats, alguns d'ells d'origen natural com la cafeïna, que presenten diferent selectivitat i afinitat per als diferents subtipus de receptors d'adenosina. No obstant això, també existeixen antagonistes que no tenen com a base la metilxantina, com ara compostos de tipus triazoloquinazolina, triazolotriacina o dihidropiridines (Cristalli et al., 2009).

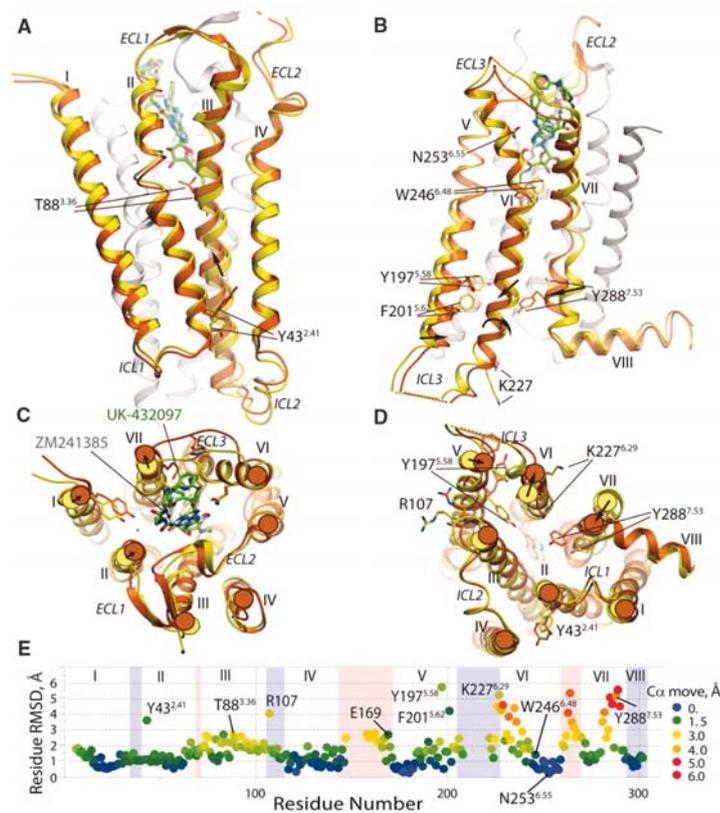


Figura 15. Anàlisi de les variacions conformacionals en el receptor A_{2A}. Es mostra superposada l'estructura dels complexos A_{2A}-UK-432097 (taronja) i A_{2A}-ZM241385 (groc). Vista lateral de les hèlix de la I a la IV (A), vista lateral de les hèlix de la V a la VIII (B), vista des de l'entorn extracel·lular (C), vista des de l'entorn intracel·lular (D). En les figures de A a D els canvis més substancials es marquen amb fletxes. Visió esquemàtica de les desviacions de cada residu en les conformacions superposades (E), les regions intracel·lulars estan marcades en blau i el bucles extracel·lulars en rosa. *Extret de Xu et al., 2011.*

3.2.2 Paper de l'adenosina al SNC.

L'adenosina és secretada per la majoria de cèl·lules, incloent-hi neurones i cèl·lules glials. Així, l'adenosina es veu implicada en processos fisiològics i patològics a nivell de tot l'organisme: la inhibició de l'alliberament de neurotransmissors excitadors, la inhibició de l'activitat motora espontània, la diferenciació i la migració neuronal (Rivkees et al., 1995; Svenningsson et al., 1999.; Canals et al., 2005), el coneixement i la memòria (Fredholm et al., 2000; Fontinha et al., 2009), la regulació de la funció respiratòria i dels processos relacionats amb el son (Antle et al., 2001; Bjorness et al., 2009; Longordo et al., 2009), l'ansietat (Johansson et al., 2001) a més de la neuroprotecció en episodis d'hipòxia i isquèmia. També s'ha relacionat amb les malalties d'Alzheimer (Maia

i DeMeuronea, 2002), de Parkinson (Schwarzschild et al., 2002; Jenner et al., 2009), de Huntington (Reggio et al., 1999; Popoli et al., 2008), esquizofrènia (Ferré et al., 1997; Wardas, 2008), epilèpsia (Dunwiddie i Masino, 2001; Ribeiro et al., 2003) i drogoaddicció (Maldonado et al., 1996; Manzoni et al., 1998; Knapp et al., 2001; Brown i Short, 2008).

Al cervell, els dos principals subtipus de receptors d'adenosina, A_1 i A_{2A} , s'expressen de forma pre i postsinàptica. El receptor A_1 es localitza de forma ubiqua a tot el cervell i en concret, s'expressa abundantment al còrtex, cerebel, hipocamp i la medula espinal. El receptor A_{2A} té una expressió més restringida, es troba altament expressat a les neurones GABAèrgiques estriatopallidals i al bulb olfatori però també es troba en petites quantitats a altres regions cerebrals (Figura 16; Ribeiro et al., 2002; 2003).

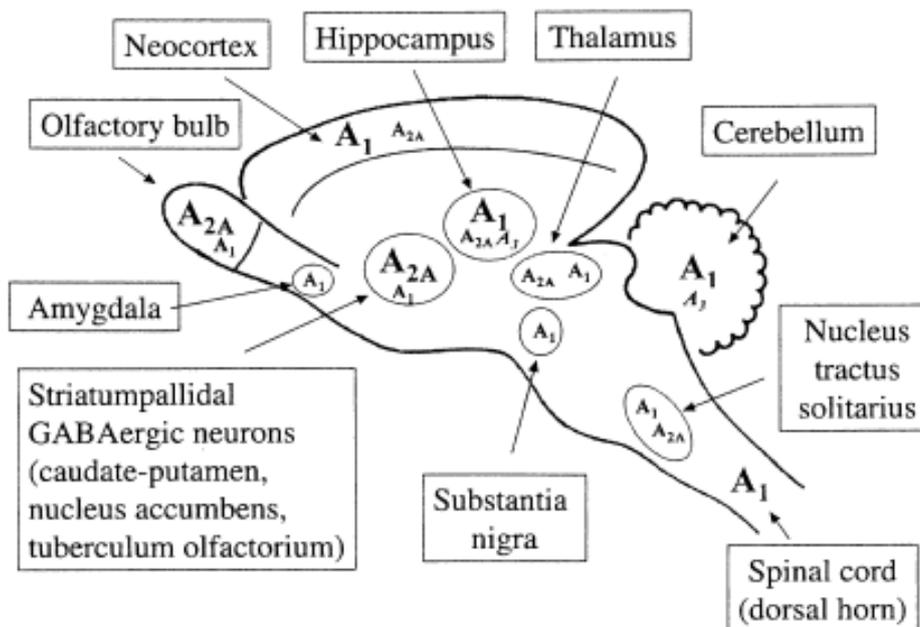


Figura 16. Expressió diferencial dels receptors d'adenosina al cervell. Representació esquemàtica de l'expressió dels receptors d'adenosina al cervell on una mida de lletra major indica una major expressió del receptor a l'àrea indicada. *Extret de Ribeiro et al., 2003.*

A nivell sinàptic, l'adenosina no és un neurotransmissor, però actua amb característiques similars en algunes neurones. A través dels receptors A_1 comparteix moltes característiques atribuïdes al GABA, el principal neurotransmissor inhibitor. Així, tant el GABA com l'adenosina són les principals molècules en el control de la transmissió glutamatèrgica al SNC. L'activació del receptor A_1 per adenosina inhibeix l'alliberament de glutamat i permet desconnectar fisiològicament interneurons GABAèrgiques, un procés

que es dona en situacions d'intens alliberament d'adenosina, com en casos d'hipòxia (Sebastiao et al., 2001). El receptor A_{2A} en canvi, és un dels principals neuromoduladors presinàptics (Schiffmann et al., 2007) i és capaç d'incrementar l'alliberament de GABA en terminals nerviosos de l'hipocamp (Cunha i Ribeiro, 2000).

3.3 Interrelació entre els receptors A_{2A} d'adenosina i D_2 de dopamina a l'estriat.

Com s'ha dit anteriorment els receptors A_{2A} d'adenosina i D_2 de dopamina codistribueixen a l'estriat i colocalitzen a les neurones GABAèrgiques estriatopal·lidals. Donat que l'estriat és el principal component dels ganglis basals implicat en les funcions motores, cognitives i límbiques (Calabresi et al., 1997; Packard i Knowlton, 2002) ha suscitat un gran interès estudiar si l'adenosina pot modular la transmissió dopaminèrgica. Com que les alteracions en les vies dopaminèrgiques estriatals estan implicades en una gran varietat de desordres neurològics i psiquiàtrics com ara la síndrome de Tourette, l'esquizofrènia, l'addicció a drogues i especialment la malaltia de Parkinson (Berke i Hyman, 2000; Carlsson et al., 2001; Steeves i Fox, 2008), s'han estudiat els receptors d'adenosina com a diana terapèutica alternativa als receptors de dopamina.

La majoria dels receptors d'adenosina a l'estriat es troben a les neurones GABAèrgiques eferents (Rivkees et al., 1995; Schiffmann et al., 1991). Tant a les neurones estriatopal·lidals com a les neurones estriatonegroentopedunculars hi ha receptor A_1 , mentre que l' A_{2A} es restringeix únicament a les neurones estriatopal·lidals de la via indirecta (Ferré et al., 1997; Schiffmann et al., 1991). Com a resultat d'aquestes localitzacions anatòmiques existeix una codistribució específica entre el receptor A_{2A} i el receptor D_2 de dopamina, mentre que el receptor A_1 pot distribuir tant amb els receptors D_1 com amb els D_2 . Concretament, els receptors A_{2A} i D_2 es localitzen a les dendrites de les neurones estriatopal·lidals en una proporció del 69 al 81%, encara que també poden trobar-se als terminals axònics d'aquestes neurones en una proporció del 18 al 28% (Rosin et al., 1998).

L'adenosina i la dopamina exerceixen efectes oposats a l'estriat. La primera indicació d'una interacció antagònica entre els seus receptors es va obtenir en analitzar el comportament d'animals model de la malaltia de Parkinson (Fuxe i

Ungerstedt, 1974). Es van utilitzar antagonistes no selectius dels receptors d'adenosina, com cafeïna i teofilina, en combinació amb L-DOPA o altres agonistes dels receptors de dopamina i es va observar un augment de l'activitat motora produïda pels fàrmacs dopaminèrgics sols. En estudis posteriors es va descriure que els receptors A_1 i A_{2A} presents a l'estriat mitjançaven els efectes de depressió motora dels agonistes adenosinèrgics i els efectes d'estimulació motora dels antagonistes dels receptors d'adenosina (Ferré et al., 1992; Ferré et al., 1997).

Les interaccions antagòniques entre els receptors A_{2A} i D_2 han estat descrites a nivell bioquímic, funcional i de comportament. Existeixen nombroses evidències de la interacció funcional entre aquests receptors. Per exemple, en preparacions de membranes d'estriat de rata, l'activació dels receptors A_{2A} disminueix l'afinitat dels receptors D_2 pels seus agonistes i també la seva senyalització (Ferré et al., 1991). D'altra banda, l'activació dels receptors D_2 antagonitza la senyalització dels receptors A_{2A} a través de la proteïna G_{olf} (Kull et al., 1999). Aquests efectes podrien ser explicats parcialment per un *cross-talk* a nivell de segons missatgers, però ja suggeriren la interacció molecular entre ambdós receptors. No obstant això, no va ser fins al 2002 quan, com a resultat d'experiments de coimmunoprecipitació i colocalització, es va començar a parlar de l'existència dels complexos heteromèrics A_{2A} - D_2 en membranes cel·lulars, tant de cèl·lules transfectades com de cultius primaris de neurones estriatals (Hillion et al., 2002). A més, és remarcable senyalar que l'exposició prolongada als antagonistes d'aquests receptors resulta en una coagregació, una cointernalització i una codesensibilització d'ambdós receptors (Hillion et al., 2002). La confirmació definitiva de la formació d'heteròmers A_{2A} - D_2 es dugués a terme al nostre grup mitjançant experiments de BRET i de FRET en cèl·lules *in vivo* (Canals et al., 2003) i fou posteriorment corroborat per altres laboratoris (Kamiya et al., 2003). Canals *et al.*, mitjançant tècniques computacionals i d'un mutant del receptor D_2 (una construcció quimèrica D_2 - D_1) també van establir alguns dels determinants estructurals implicats en la dimerització d'aquests dos receptors (Figura 16; Canals et al., 2003).

En la formació dels complexos A_{2A} - D_2 semblen ser importants els dominis TM5 i TM6 i el tercer bucle intracel·lular del receptor D_2 , mentre que per part del receptor A_{2A} hi participen el domini TM4 i C-terminal. Posteriorment s'han obtingut evidències que les interaccions electrostàtiques entre dues regions de residus bàsics del bucle intracel·lular 3 del receptor D_2 i certs residus àcids de la part més distal de la cua C-terminal del receptor A_{2A} poden ser determinants en

la formació de l'heterodímer (Ciruela et al., 2004). Malgrat que l'exposició prolongada a agonistes d'ambdós receptors doni lloc a una coagregació, observada per tècniques d'immunocitoquímica, el tractament amb els lligands d'aquests receptors, de forma individual o conjunta, no altera el grau de dimerització. Aquest fet suggereix que els dímers es formen al RE (Canals et al., 2003).

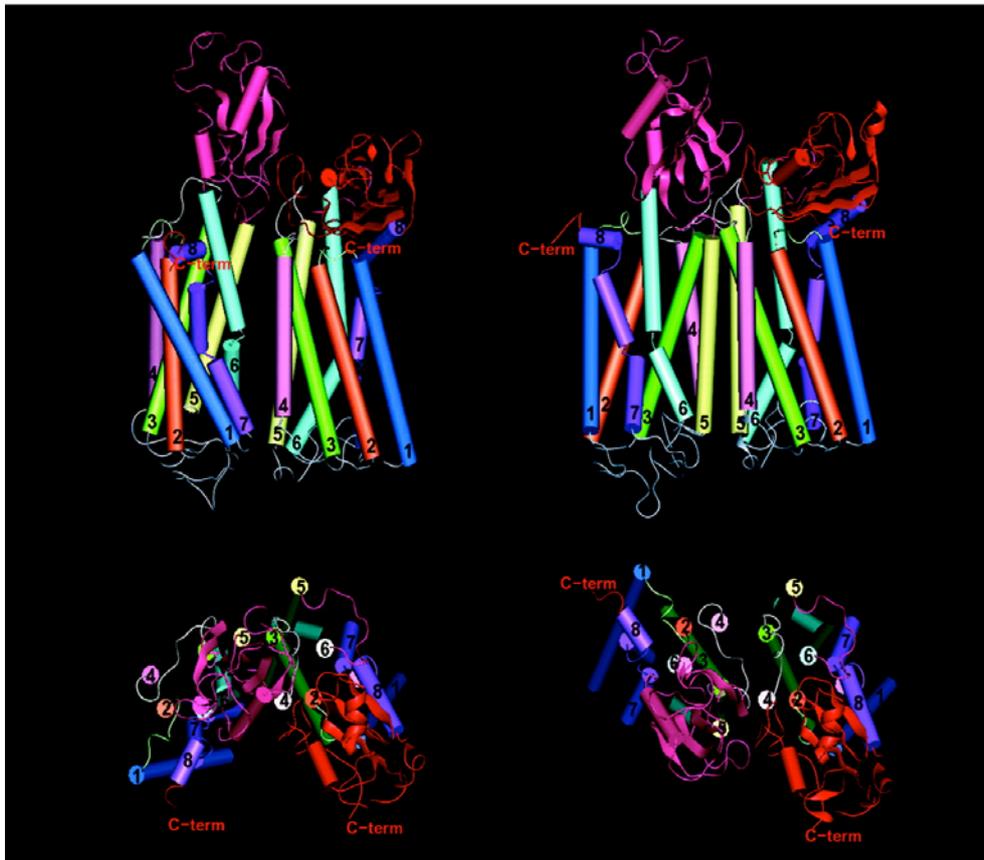


Figura 16. Representació del dímer A_{2A}-D₂. En les imatges superiors les hèlix estan perpendiculars a la membrana plasmàtica amb els dominis intracel·lulars (de color rosa) a la part superior i els dominis extracel·lulars (de color gris) a la part inferior. En les imatges inferiors es mostren els receptors des d'un punt de vista perpendicular a la membrana des de l'interior de la cèl·lula, amb el mateix codi de colors. *Extret de Canals et al., 2003.*

4. Receptors de cannabinoides.

El Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) és el principi actiu de la marihuana, els efectes de la qual es coneixen des del segle I aC i es donen a nivell de tot l'organisme: eufòria, relaxació, taquicàrdia, vasodilatació, immunosupressió, augment de l'apetit, i hipotèrmia (Ameri, 1999; Piomelli, 2003; DiMarzo et al., 2004). L'any 1975, Lawrence i Gill van interpretar els efectes del THC com una modificació no específica de la fluïdesa de les membranes cel·lulars, a causa de la seva naturalesa lipídica. Però l'any 1988 Howlett et al. van descriure unions d'alta afinitat dels cannabinoides a les membranes cerebrals, fet que duia a pensar que la seva acció podria estar mitjançada per receptors específics (Devane et al., 1998; Howlett et al., 1990). Va ser l'any 1990 quan es feia escombratge de GPCR orfes amb diversos possibles lligands que es va clonar el primer receptor de la família dels cannabinoides, anomenat CB₁ (Matsuda et al., 1990; Figura 17)

El receptor CB₁ és el més abundant i àmpliament distribuït al cervell, fet que explica la varietat dels seus efectes. La major densitat però, es troba als ganglis basals (Herkenham et al., 1990) i per això aquests receptors es consideren una diana excepcional per al control del moviment. A l'estriat, els receptors CB₁ es localitzen als terminals GABAèrgics i glutamatèrgics tant a les zones pre-, post-com extrasinàptiques (Köfalvi et al., 1995). Altres àrees on són particularment abundants són el cerebel, hipocamp i còrtex on juguen un paper important en fenòmens cognitius i de memòria. No obstant, l'expressió d'aquest receptor no es limita a SNC sinó que també està present al sistema perifèric on regula la percepció del dolor (Iversen i Chapman, 2002; Beltramo, 2009), funcions cardiovasculars (Randatl et al., 2002; Hiley, 2009), reproductives (Park et al., 2004) i gastrointestinals (Di Carlo i Izzo, 2003; Fioramonti i Bueno, 2008). També té efecte en l'alliberament de pèptids hipotalàmics i la regulació de nivells d'hormones esteroidees, exercint una modulació de la ingesta i de l'eix adrenal-pituitari-hipotalàmic (Wenger i Moldrich, 2002).

L'any 1993 es va clonar un altre receptor cannabinoide, que es va anomenar CB₂ (Munro et al., 1993; Figura 17). En un principi es va creure que es trobava principalment en cèl·lules i teixits del sistema immunitari (Pertwee et al., 1997), on tindria un paper important en la inflamació i el dolor crònic (Klein et al., 2003). Més recentment se n'ha descrit l'expressió en cèl·lules de la glia i microglia (Sánchez et al., 2001; Walter et al., 2003; Nuñez et al., 2004) i en neurones del SNC (Gong et al., 2006; Brusco et al., 2008; Lanciego et al., 2011).

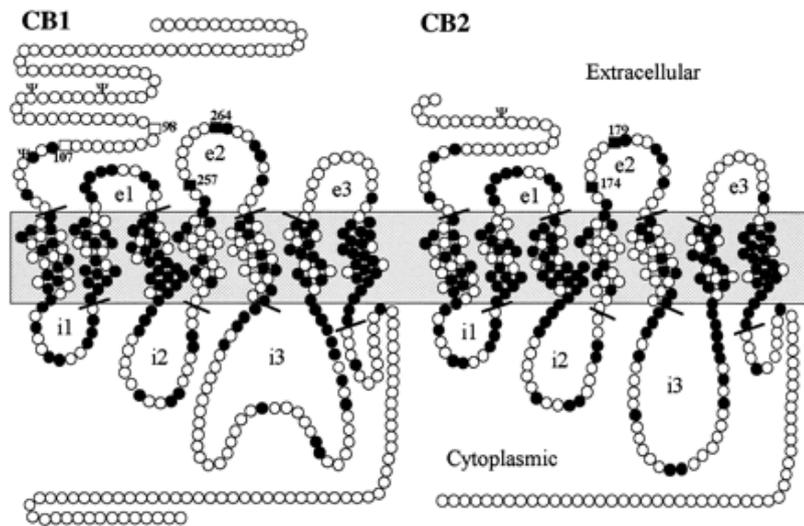


Figura 17. Estructura dels receptors CB1 i CB2 humans. En negre es representen els aminoàcids comuns en ambdós receptors, i els llocs de glicosilació amb marquen amb Ψ . Extret de Shire et al., 1996.

El descobriment d'aquests receptors va provocar la cerca de les substàncies endògenes que els activen. El primer lligand endogen identificat va ser l'anandamida (N-araquidonoïletanolamina; Devane et al., 1992) i posteriorment el 2-araquidonoilglicerol (2-AG; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1996). L'anandamida és una molècula petita, de naturalesa lipídica i que té moltes característiques en comú amb els icosanoides, mediadors de la inflamació, amb varies funcions en la inflamació neuronal (Piomelli i Greengard, 1990). En un principi no es cregué que l'anandamida fos un endocannabinoides fisiològic sinó un metabòlit originat en la degradació post-mortem del cervell (Kempe et al., 1996) però estudis posteriors en van demostrar la síntesi i l'alliberament als terminals nerviosos (DiMarzo et al., 1994; Giuffrida et al., 1999; Walker et al., 1999). El 2-AG, com altres monoacilglicerols, està present en diverses vies del metabolisme lipídic i es troba en altes concentracions al cervell. És uns 200 cops més abundant que l'anandamida (Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997) i es creu que pot tenir un paper més constitutiu que senyalitzador. Actualment s'han identificat altres endocannabinoides com l'èter de noladin, la virodhamina o la N-araquidonoïldopamina (NADA). L'èter de noladin és un anàleg del 2-AG que s'uneix i activa els receptors CB₁ (Hanus et al., 2001) tot i que el seu paper en el cervell en condicions no patològiques no sembla transcendent (Oka et al., 2003). La virodhamina és un antagonista endogen del CB₁, i tot i que és inestable en medi aquós, se n'ha detectat la presència al cervell (Porter et al., 2002).

Finalment, la NADA és un agonista dels receptors vanilloides que presenta una certa afinitat pel receptor CB₁ *in vitro* (Huang et al., 2002).

Tots aquests lligands endògens són de naturalesa lipídica i se sintetitzen a partir de certs fosfolípids presents a la membrana cel·lular (Bisogno et al., 2003; Okamoto et al., 2004). Els enzims responsables de la seva síntesi es troben a la mateixa membrana i s'activen per altes concentracions de Ca²⁺. Així, aquests compostos no s'emmagatzemen en vesícules de secreció sinó que són sintetitzats i alliberats al medi extracel·lular on i quan es necessiten. Tot i la seva capacitat, com a lípids que són, per creuar la membrana plasmàtica existeixen evidències com: la saturació del sistema, la relació alta, la dependència amb la temperatura o la selectivitat del substrat) que porten a pensar que n'existeixen transportadors tant per l'alliberament com per la recaptació, que encara no han estat identificats (Beltramo et al., 1997; Hillard et al., 1997).

El paper principal dels cannabinoides és el de missatgers retrògrads. Els endocannabinoides són alliberats per les neurones postsinàptiques despolaritzades, ja que en aquestes cèl·lules la despolarització dóna lloc a l'entrada de Ca²⁺, que és un activador dels enzims responsables de la biosíntesi d'endocannabinoides. Un cop sintetitzats difonen cap a la neurona presinàptica on interaccionen amb el receptor CB₁. L'acció principal d'aquesta activació és la inhibició de l'alliberament de neurotransmissors, tant per l'activació de canals de K⁺ com la inhibició de canals de Ca²⁺, que és el senyal que dispara a la membrana la fusió de les vesícules que contenen els neurotransmissors. Tot i així també es troben receptors CB₁ a nivell postsinàptic i extrasinàptic, on l'activació d'aquests disminueix el potencial d'acció (Köfalvi et al., 2005).

Els cannabinoides exerceixen una modulació de la funció motora (Howlett et al., 1990) i per tant, tenen un elevat potencial terapèutic en malalties com la de Parkinson i de Huntington (Brotchie, 2003; Lastres-Becker et al., 2003; Van der Stelt i Di Marzo, 2003). A més, s'ha descrit que una hiperactivitat permanent del sistema endocannabinoide pot contribuir al desenvolupament d'alguns símptomes en Parkinson i Alzheimer, com la inhibició de l'activitat motora i la pèrdua de memòria, respectivament (Mazzola et al., 2003). L'esclerosi múltiple també és una malaltia que pot resultar d'una permanent activitat del sistema endocannabinoide (Macarrone et al., 2011).

4.1 Interaccions entre els receptors CB₁ de cannabinoides, D₂ de dopamina i A_{2A} d'adenosina.

La dopamina i els endocannabinoides presenten interaccions complexes als ganglis basals. Per exemple, l'estimulació de l'estriat amb cannabinoides incrementa la síntesi i l'alliberament de dopamina (Romero et al., 1995; Szabo et al., 1998), però a la vegada, l'estimulació dels receptors D₂ estriatals de rata desencadena *in vivo* l'alliberament d'anandamida (Giuffrida et al., 1999).

El receptor CB₁ s'expressa de manera abundant a l'estriat, tant en les neurones de la via directa com de la indirecta (Herkenham et al., 1991) així com en les interneurons GABAèrgiques que controlen les neurones de projecció. El receptor D₂ es troba restringit principalment a les neurones de la via indirecta, i per tant és en aquestes on hi pot haver una interacció entre els dos receptors. En aquestes neurones, la colocalització es dona bàsicament a nivell de dendrites, encara que també pot trobar-se en petits terminals axònics (Ferré et al., 1997). També hi ha coexpressió d'ambdós receptors als terminals glutamatèrgics corticoestriatals, una de les vies d'entrada a l'estriat, on l'activació d'ambdós receptors disminueix l'alliberament de glutamat (Yin i Lovinger, 2006; Bamford et al., 2004), un fet que sembla important tant per al control motor com per a l'aprenentatge (Jog et al., 1999). Una evidència clara de què ambdues molècules poden interaccionar molecularment és el fet que de forma individual aquests receptors inhibeixen l'estimulació de l'AC (Meschler i Howlett, 2001) mentre que l'activació conjunta, o simplement la coexpressió dels receptors en cultius de neurones estriatals, canvia l'acoblament de la proteïna G_{i/o} a la proteïna G_s (Jarratian et al., 2004).

L'any 2005, Kearn va suggerir l'existència dels heterodímers de receptors D₂-CB₁ mitjançant experiments de coimmunoprecipitació (Kearn et al., 2005). En aquest estudi s'observà que en absència d'agonistes ambdós receptors coimmunoprecipitaven, però que els agonistes del receptor CB₁ tenien tendència a incrementar la coimmunoprecipitació entre ells, mentre que els antagonistes tenien tendència a disminuir-la. A més, es va observar un comportament similar a l'observat amb l'estimulació de l'AC, però aquest cop a nivell d'activació de la via de les MAPK. La coexpressió d'ambdós receptors incrementa de forma considerable la fosforilació de ERK1/2 mitjançada per l'activació de CB₁, però no de D₂, comparada amb el senyal obtingut quan els receptors s'expressen sols. A més aquesta activació es independent del

tractament amb toxina pertusis pel que se'n dedueix que l'acoblament dels receptors coexpressats és a la proteïna G_s enlloc de la $G_{i/o}$ (Kearn et al., 2005).

Els receptors A_{2A} i CB_1 codistribueixen en diverses àrees del SNC, com l'estriat, el cerebel, l'hipocamp i el còrtex (Herkenham et al., 1991; Svenningsson et al., 1999). A més, l'adenosina i els cannabinoides participen en la modulació de diferents processos en comú com la nonicepció, l'ansietat, l'agressivitat, l'activitat motora i l'addicció a les drogues (Fredholm i Svenningsson, 2003; Piomelli, 2003). No obstant, s'ha publicat poc sobre la interacció funcional entre aquests dos receptors.

En les vies relacionades amb la drogoaddicció, la transmissió dopaminèrgica del sistema mesolímbic juga un paper crucial en la modulació dels processos de recompensa (Koob, 1996; Di Chiara, 2002). L'adenosina regula la transmissió dopaminèrgica a través de les interaccions antagòniques entre els receptors A_1/D_1 i A_{2A}/D_2 (Franco et al., 2000; Canals et al., 2003). Els cannabinoides, també controlen aquesta via a través de les interaccions entre CB_1 i D_2 . Així doncs, tant A_{2A} com CB_1 poden tenir un paper rellevant en fenòmens d'addicció a drogues. De fet, està descrit que l'administració crònica d'elevades dosis de cannabinoides com el THC o l'HU-210 produeixen dependència física en animals d'experimentació (Maldonado i Rodríguez de Fonseca, 2002) i que l'adenosina juga un paper crucial en els fenòmens de dependència física i abstinència a diferents drogues d'abús.

Mitjançant l'ús de ratolins *knock-out* (KO) s'ha demostrat que els animals que tenen deletat el gen per al receptor A_{2A} presenten una síndrome d'abstinència per als opioides major que els WT (Berrendero et al., 2003), mentre que els signes d'abstinència en el KO de CB_1 són menors (Ledent et al., 1999). Per tant, ambdós receptors juguen un paper oposat en l'expressió de la dependència a opioides. Per altra banda, també s'ha descrit que les manifestacions sistemàtiques de la dependència a THC induïdes després d'una administració de l'agonista invers de CB_1 , SR 141716A, estan accentuades en el KO de A_{2A} i que aquest ratolí presenta una reducció important dels efectes de recompensa induïts per THC (Soria et al., 2004). Respecte al control del moviment, està descrit que el doble KO per A_{2A} i CB_1 presenta una activitat espontània reduïda, a més de nivells més alts d'ansietat (Berrendero et al., 2003). En aquest sentit, diversos estudis suggereixen el potencial terapèutic de drogues que actuen sobre aquests dos receptors conjuntament en el tractament de patologies motores com la de Parkinson. No fou fins el 2007 quan es va

demostrar que ambdós receptors podien heteromeritzar. Mitjançant estudis de BRET es pogué demostrar la formació d'heteròmers entre A_{2A} i CB_1 en cultius cel·lulars (Carriba et al., 2007). A més, en cultius de neuroblastomes humans es va observar que el bloqueig del receptor A_{2A} induïa els efectes de la depressió motora produïts per l'agonista del receptor CB_1 (Carriba et al., 2007).

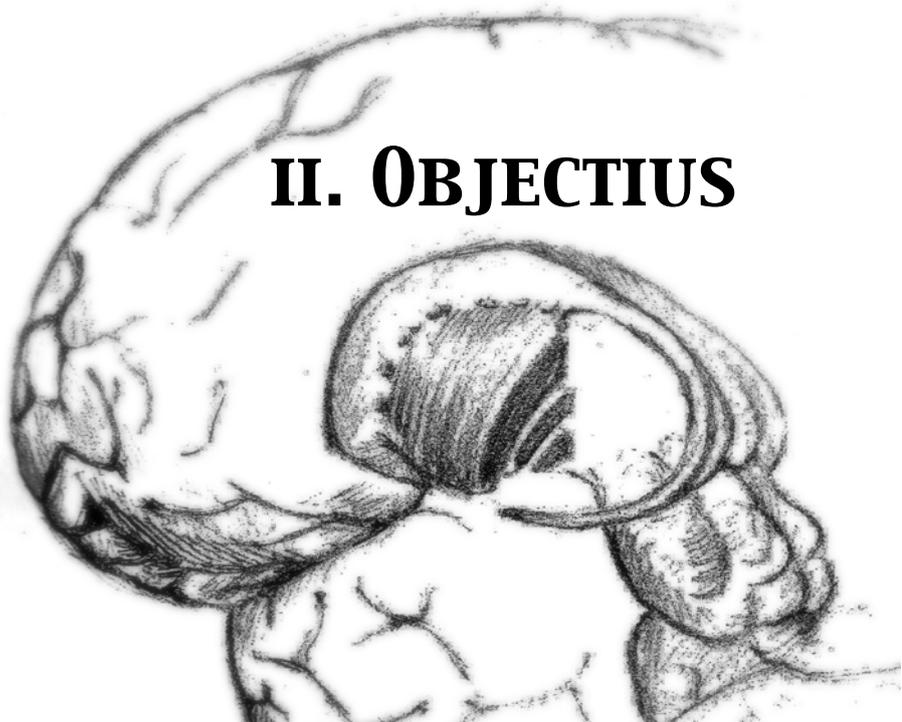
Les drogues d'abús produeixen diferents respostes, a través de diferents molècules o receptors; no obstant això les caracteritza la capacitat de provocar addicció. Això suggereix que hi ha un mecanisme en comú que contribueix al desenvolupament de l'addicció. Els increments de dopamina extracel·lular al nucli accumbens (Robbins i Everitt, 1999) i la senyalització mitjançada per PKA (Nestler, 2001) es consideren implicats en tots els fenòmens d'addicció. A les neurones estriatals de projecció està altament expressada la proteïna DARPP-32 (*Dopamine and cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate Regulated PhosphoProtein*, 32 kDa; Walaas i Greengard, 1984) que actua com a modulador de la via de l'AMPC. La fosforilació catalitzada per PKA a la Thr34 converteix a DARPP-32 en un inhibidor de la PP-1 (*Protein Phosphatase 1*; Hemmings et al., 1984) i inhibeix la desfosforilació de les proteïnes diana que vénen a continuació de la via, amplificant els efectes produïts per l'activació de la cascada AMPC/PKA (Greengard, 2001). DARPP-32 està implicada en la generació de la resposta motora produïda per diverses classes de drogues que activen o inhibeixen la via AMPC/PKA a les neurones estriatals (Andersson et al., 2005). Les neurones estriatopallidals coexpressen els receptors A_{2A} d'adenosina i D_2 de dopamina. En aquestes cèl·lules l'estat de fosforilació de la proteïna DARPP-32 és conseqüència d'un balanç entre l'activació de A_{2A} , que estimulen la PKA, i l'activació dels receptors D_2 que inhibeixen l'activitat de PKA i activen la fosfatasa PP-2B, que desfosforila DARPP-32 (Svenningsson et al., 2000). Considerant que la cascada de senyalització dels de receptor CB_1 és similar a la de D_2 caldria pensar que els agonistes de CB_1 produeixen una inhibició de la fosforilació de DARPP-32 a la Thr34. No obstant això, l'activació de CB_1 produeix una marcada reducció de l'activitat motora relacionada amb l'activació de DARPP-32 a la Thr34 (Andersson et al., 2005) i aquesta disminució motora es veu atenuada per la inactivació genètica de DARPP-32. D'altra banda, la inactivació genètica de D_2 o A_{2A} disminueix tant la fosforilació de DARPP-32 com l'acció d'inhibició motora provocada pels agonistes cannabinoides (Andersson et al., 2005). Aquests resultats apuntarien a què el receptor CB_1 actua contrarestant la transmissió a través del receptor D_2 i d'aquesta manera

facilitant –o desinhibint- l'activació de AMPc/PKA/DARPP-32 dependent del receptor A_{2A} a la via indirecta de l'estriat.

En contraposició, Yao et al., han descrit un *cross-talk* en el sentit contrari (positiu) entre els receptors CB_1 i D_2 . Aquests autors observen que concentracions subòptimes d'agonistes d'ambdós receptors, que per separat no tenen cap efecte, activen el senyal AMPc/PKA de forma sinèrgica (Yao et al., 2003). Aquesta sinergia està corroborada pel fet que els agonistes de D_2 potencien la sedació induïda per cannabinoides a dosis que són inefectives quan s'administren soles (Meschler et al., 2000). Perquè aquesta sinergia es doni és necessària l'activació dels receptors A_{2A} , i els antagonistes d'aquests receptors poden fins i tot atenuar el desenvolupament de fenòmens addictius. Així doncs, aquest fet sembla conferir una hipersensibilitat a cannabinoides a més d'incrementar la sensibilitat de D_2 quan els tres receptors estan expressats en una mateixa cèl·lula. Per tant aquest *cross-talk* sembla important en l'activació induïda per drogues en les neurones de projecció que s'originen al nucli accumbens (Yao et al., 2003).

Aquesta sèrie d'evidències van portar al nostre grup a desenvolupar la tècnica del SRET (Sequential Resonance Energy Transfer; Carriba i Navarro et al., 2008), que permet la detecció d'heteròmers de tres receptors diferents mitjançant la combinació seqüencial de les tècniques de BRET i de FRET. Amb l'ús d'aquesta tècnica es van detectar per primer cop en cèl·lules vives oligòmers dels receptors A_{2A} , D_2 i CB_1 i obre les portes a una nova interpretació dels fenòmens de *cross-talk* entre aquests receptors basada en les interaccions a nivell de membrana (Carriba i Navarro et al., 2008; Navarro et al., 2008).

II. OBJECTIUS



II. OBJECTIUS

La dopamina desenvolupa un paper molt important en la regulació del funcionament dels ganglis basals. La transmissió dopaminèrgica està involucrada en activitats neurals clau, com el control de la locomoció, l'adició, el coneixement, l'aprenentatge o les funcions de memòria. La desregulació d'aquest sistema dona lloc a diverses patologies com ara la malaltia de Parkinson o l'esquizofrènia. La dopamina actua per interacció amb receptors de dopamina de les famílies D₁ (receptors D₁ i D₅) i D₂ (receptors D₂, D₃ i D₄) que estan acoblats a proteïna G, formant part, per tant, del grup de GPCR. Els receptors de dopamina D₁ i D₂ han estat el principal objecte d'estudi en aquesta Tesi i **conèixer alguns mecanismes pels quals agonistes i antagonistes clàssics, nous lligands o altres receptors de membrana, poden modular les propietats farmacològiques dels receptors D₁ o D₂**, constitueix l'Objectiu General d'aquesta Tesi.

Conèixer el moviment i el tràfic dels receptors a nivell de membrana, i com aquest pot modificar-se per unió d'agonistes als receptors, és crucial per entendre el funcionament dels GPCR. L'estudi de la dinàmica dels receptors ha avançat significativament amb l'ús de proteïnes de fusió fluorescents unides al receptor i la microscòpia de fluorescència. Una manera de controlar la força sinàptica d'un receptor és regular-ne la seva presència a la membrana plasmàtica en localitzacions específiques (Dumoulin et al., 2009). Per tot això, el primer objectiu d'aquesta tesi ha estat:

Objectiu 1. Desenvolupar un mètode que permeti caracteritzar la dinàmica d'un receptor a la membrana plasmàtica mitjançant la microscòpia confocal de disc giratori, utilitzant com a model els receptors D₂ de dopamina.

Els receptors de dopamina D_1 i D_2 estan involucrats en les funcions de l'estriat, i per tant són diana d'un elevat nombre d'agents terapèutics. Un aspecte fonamental en el disseny de fàrmacs és la determinació de l'afinitat de l'agent terapèutic per a la seva diana i un dels problemes que es poden plantejar és que la diana no estigui perfectament definida. La visió clàssica dels receptors com a entitats individuals ha canviat en els darrers anys i s'ha descrit la formació d'homodímers entre els GPCR, incloent-hi els receptors de dopamina. Aquests dímers actuarien com una unitat funcional i per tant s'ha de tenir en compte aquest fet a l'hora d'estudiar les propietats farmacològiques d'aquests receptors. Al nostre grup s'ha desenvolupat un model per l'estudi de la unió de lligands als receptors que té en compte la dimerització (Franco et al., 2006) i del qual se'n deriven nous conceptes importants a l'hora d'analitzar els experiments d'unió de lligands, com la cooperativitat. En aquest marc, el segon objectiu d'aquesta tesi ha estat:

Objectiu 2. Determinar els paràmetres farmacològics d'homodímers de GPCR a partir de l'aplicació del *two-state dimer receptor model*.

Tal com s'ha comentat, els receptors de dopamina són una diana clau en el tractament de diferents patologies que afecten diferents aspectes del SNC. És per això que és important la recerca sobre nous fàrmacs que puguin unir-se de manera diferencial a aquests receptors i que puguin suposar la base per a diferents tractaments, per això el tercer objectiu d'aquesta tesi ha estat:

Objectiu 3. Caracteritzar la unió d'un nou lligand derivat de la indolo[2,3]-quinolizidina per als receptors D_1 i D_2 de dopamina i estudiar-ne la seva funcionalitat.

Les vies dopaminèrgiques estan profundament implicades en l'addicció a cocaïna. Gran part dels efectes de la cocaïna s'atribueixen a la sobreestimulació dels receptors de dopamina provocada pel bloqueig dels transportadors de dopamina (DAT) per la cocaïna. Malgrat això, la cocaïna també pot unir-se a altres proteïnes com ara els receptors σ , i s'ha proposat que aquests podrien interaccionar amb els de dopamina. Al nostre grup s'han descrit els efectes sobre la transmissió dopaminèrgica que provoca la unió de cocaïna a σ_1 en

heteròmers de receptors σ_1 -D₁, però es desconeixia totalment si els receptors σ_1 podien interaccionar amb el receptor D₂ i modular al·lostèricament la seva funció. Per això, el quart objectiu d'aquesta Tesi ha estat:

Objectiu 4. Investigar si els receptors σ_1 poden formar heteròmers amb els receptors D₂ de dopamina i estudiar els efectes sobre els receptors D₂ de dopamina que provoca la unió de cocaïna als receptors σ_1 .

Un dels aspectes més actuals en l'estudi dels GPCR és la seva capacitat de formar heteròmers amb altres GPCR i això és important perquè la formació d'heteròmers dóna lloc a un nou nivell de regulació. Des que es va descriure la formació d'heteròmers entre els receptors de dopamina i d'adenosina aquests complexos han estat en el punt de mira del desenvolupament de noves teràpies per a diferents patologies. En els darrers anys han sortit al mercat diferents fàrmacs amb diferents característiques d'unió a aquests receptors, que s'utilitzen tant en teràpia com en recerca científica. Aquestes teràpies es basen en què la unió d'agonistes al receptor A_{2A} modula negativament la unió d'agonistes al receptor D₂ però es desconeixia com era exactament aquesta modulació i si la unió de lligands del receptor A_{2A} modificava la unió d'antagonistes al receptor D₂. Considerant això el cinquè objectiu de la Tesis ha estat:

Objectiu 5. Investigar la modificació de les propietats farmacològiques que provoquen tant els agonistes com els antagonistes dels receptors A_{2A} d'adenosina sobre la unió d'agonistes i antagonistes als receptors D₂ de dopamina.

La malaltia de Parkinson és un dels paradigmes on s'ha proposat que l'heteromerització entre els receptors en sigui una diana clau per al tractament. L'efecte antagònic entre adenosina i dopamina ha estat proposat com una via per tractar els pacients de Parkinson i minimitzar els efectes negatius del tractament amb L-DOPA. També s'ha vist que els receptors de cannabinoides poden intervenir en el complex heteromèric format pels receptors A_{2A} i D₂ i alterar-ne les seves propietats. Malgrat això se sap molt poc del que passa amb

els heteròmers quan evoluciona la malaltia o quan els pacients es tracten amb L-DOPA, per això el sisè i darrer objectiu d'aquesta tesi ha estat:

Objectiu 6. Estudiar els canvis en l'expressió, la farmacologia i l'heteromerització dels receptors D_2 de dopamina, A_{2A} d'adenosina i CB_1 de cannabinoides en models animals de la malaltia de Parkinson en diferents estats de progressió.

III. MATERIALS I MÈTODES



III. MATERIALS I MÈTODES.

Vectors d'expressió, proteïnes de fusió i receptors mutants.

S'han utilitzat els cDNA humans dels receptors A_{2A} , D_2 (o D_{2L} ; isoforma llarga) i σ_1 clonats en el vector *pcDNA3.1*. La serina de la posició 374 del domini C-terminal del receptor A_{2A} s'ha mutat a alanina per a obtenir el receptor A_{2A}^{A374} . Aquesta mutació s'ha realitzat per mutagènesi dirigida utilitzant el kit de Cellogenetics (Ijamsville, EUA). Els cDNA dels receptors A_{2A} , A_{2A}^{A374} , D_2 i σ_1 han estat amplificats sense el seu codó de parada utilitzant encebadors sentit i antisentit que contenen llocs de restricció únics *EcoRI* i *BamHI* (o *EcoRI* i *KpnI* per al receptor σ_1). Els fragments amplificats s'han subclonat per estar en pauta amb les proteïnes *Rluc*, EYFP o GFP² als llocs de restricció de *EcoRI* i *BamHI* o *KpnI* dels vectors que expressen *Rluc* (pRLuc-N1, PerkinElmer, Wellesley, EUA), EYFP, (una versió millorada de la variant groga de la proteïna GFP; pEYFP-N3; Clontech, Heidelberg, Alemanya) o GFP² (pGFP²-N2; Clontech). Amb aquest procés s'han obtingut els plasmidis que expressen els receptors fusionats a les proteïnes bioluminiscentes o fluorescents corresponents per l'extrem C-terminal dels receptors anomenats: D_2 -*RLuc*, D_2 -YFP, D_2 -GFP², σ_1 -*RLuc*, σ_1 -YFP, A_{2A} -*RLuc*, A_{2A} -YFP i A_{2A}^{A374} -*RLuc*). Seguint el mateix procediment, també s'han obtingut proteïnes de fusió dels receptors D_2 i σ_1 fusionats a les proteïnes cRLuc8 i nRLuc8 (corresponents a les parts C- i N-terminals de la proteïna *RLuc*) i a nVenus i cVenus (corresponents a les parts C- i N-terminals de la proteïna fluorescent Venus). El cDNA de la proteïna de fusió 5HT_{2B}-YFP ha estat gentilesa de la Dra. Irma Nardi de la Universitat de Pisa (Itàlia). Les proteïnes de fusió obtingudes s'expressen a la membrana cel·lular, no estan sobreexpressades, i no modifiquen la funció dels receptors tal com s'ha determinat prèviament (Canals et al., 2003; Carriba et al., 2008, Navarro et al., 2010).

Cultius cel·lulars i transfecció.

Les cèl·lules HEK-293T s'han mantingut en medi DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, Paisley, Regne Unit) suplementat amb L-glutamina 2 mM, penicil·lina 50 µg/ml, estreptomina 50 µg/ml i 5% de sèrum fetal boví (FBS) inactivat per calor (tots els suplementes són de Invitrogen, Paisley, Regne Unit). Les cèl·lules CHO s'han mantingut en medi α -MEM sense nucleòsids (Gibco, Paisley, Regne unit) suplementat amb L-glutamina 2 mM, penicil·lina 50 µg/ml, estreptomina 50 µg/ml i 10% de sèrum fetal boví (FBS) inactivat per calor. Ambdós tipus cel·lulars s'han mantingut a 37 °C en una atmosfera amb un 5% de CO₂ i s'ha passat dos cops per setmana quan arribaven a una confluència del 80-90%.

Les cèl·lules HEK-293T o CHO s'han transfectat transitòriament amb els cDNA corresponents pel mètode de la polietilenimina (PEI). S'han incubat les cèl·lules durant 4 hores amb la quantitat corresponent de cDNA i amb PEI (5 ml de PEI 10 mM per cada mg cDNA)) i NaCl 150 mM en medi sense sèrum. Passades les 4 hores el medi s'ha canviat per un medi de cultiu respectiu complet. L'experiment indicat en cada cas s'ha realitzat a les 48 o 72 hores després de la transfecció.

Immunocitoquímica i immunohistoquímica.

Les cèl·lules han crescut i estat transfectades en cobreobjectes de vidre. De 48 a 72 hores després de la transfecció les cèl·lules han rebut el tractament indicat en cada cas i han estat fixades amb paraformaldehid al 4% durant 15 min i rentades amb tampó PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM i KH₂PO₄ 2 mM, a pH 7,4) que contenia glicina 20mM per saturar als grups aldehyd. Després de la permeabilització amb 0,05% de Triton X-100 en PBS durant 5 min s'han bloquejat incubant-les durant una hora amb PBS amb un 1% d'albumina sèrica bovina (BSA) a temperatura ambient. Seguidament s'han incubat o no amb els anticossos primaris durant el temps indicats en cada cas, i s'han rentat i tenyit amb l'anticòs secundari corresponent i el marcador nuclear Hoescht (Sigma, St Louis, EUA). Els cobreobjectes s'han montat usant Mowiol (Calbiochem Merck, Darmstadt, Alemanya) i s'han observat en un microscopi confocal Leica SP2. Les imatges han estat adquirides en mode seqüencial amb un objectiu d'oli 63x *Plan Aplanachromat NA 1.4* i la combinació de filtres adequats en cada cas.

Els talls estriats de ratolins *wild-type* (WT) o *knock-out* (KO) per al receptor σ_1 s'han obtingut tal com es descriu posteriorment. Per a la immunohistoquímica s'han descongelat a 4 °C, rentat amb tampó TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 7,4) i permeabilitzat amb tampó TBS amb 0,1 % de Triton X-100 durant 10 min. Els talls s'han bloquejat amb el reactiu comercial de bloqueig *Blocking reagent* (Roche, Sant Cugat del Vallès, Espanya; 1%) durant 1 h a 37 °C en atmosfera humida, i s'han incubat durant tota la nit a 4 °C en atmosfera humida amb els anticossos primaris indicats diluïts en tampó TBS amb Tween 0,1 %, BSA acetilada 0,1% (Aurion, Wageningen, Països Baixos) i SND 7%. Els talls s'han rentat amb TBS amb Tween 0,05 % i incubat durant 2h a temperatura ambient i atmosfera humida amb els anticossos secundaris corresponents, en el mateix medi. Seguidament s'han processat tal com s'ha indicat per a les cèl·lules.

Microscopia confocal de disc giratori.

Les cèl·lules han crescut i estat transfectades en plaques de 8 pous μ -slide (Ibidi, Munich, Alemanya) recobertes amb col·lagen a raó de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ i poli-D-Lisina a raó de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durant 60 min. La solució de recobriment s'ha aspirat i les plaques s'han netejat amb PBS abans de sembrar les cèl·lules. Les cèl·lules s'han transfectat transitòriament amb 0.5 μg del plàsmid D_{2L}-YFP utilitzant Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, EUA; seguint les instruccions del fabricant). Després de 48h de la transfecció l'expressió del receptor s'ha visualitzat en un mòdul de disc giratori Ultraview ERS (Perkin Elmer, Waltham, EUA) ensamblat a un microscopi invertit Axiovert 200 (Zeiss, Gottingen, Alemanya). Les dades s'han adquirit amb una càmera digital C9100-50 (Hamamatsu, Herrsching, Alemanya) equipada amb multiplicador d'electrons i sensor CCD. Aproximadament un 90% de les cèl·lules expressava la proteïna a la superfície cel·lular. Tots els paràmetres del microscopi per a l'adquisició d'imatges s'han mantingut idèntics en els diferents experiments realitzats. Per a casa assaig s'ha obtingut un apilament d'imatges utilitzant objectius d'immersió en aigua 63x o sec 40x. Per als experiments a temps a temps curts s'han adquirit dades d'un apilament de 6 μm amb trams de 1 μm cada segon durant un temps total de 6 min. Per als experiments a llarg termini, l'apilament ha estat més llarg, amb un espaïament de 5 μm i s'han adquirit cada 30 s al llarg de 3 h. Durant les adquisicions d'imatges les mostres han estat en una cambra de cultius a 37 °C en una atmosfera amb un 5% de CO₂. Les imatges adquirides s'han analitzat amb el software MATLAB 7.7 (The MathWorks, Natick, EUA).

A pesar dels avantatges de la tècnica de disc giratori s'ha observat un cert grau de fotoblanqueig (*photobleaching*). El defalliment en la intensitat de fluorescència es pot modelar d'acord amb una funció multiexponencial, i s'ha estimat prou acurat de reduir aquest model a dues funcions exponencials:

$$F(t) = A \cdot e^{-Ct} + B \cdot e^{-Dt}$$

on A, B, C i D són els coeficients de l'equació i t és el temps mesurat en segons. El defalliment de la fluorescència píxel a píxel en tota la imatge pot ser modelada segons aquesta equació biexponencial i per tant la intensitat de la fluorescència pot ser corregida. La intensitat normalitzada de fluorescència de cada píxel de seqüències d'imatges corregides s'han analitzat usant la següent equació:

$$NFI_{ij} = \frac{FI_{ij} - mF_i}{stdF_i}$$

FI_{ij} representa la fluorescència del píxel i en la imatge j , mF_i i $stdF_i$ són la mitjana i la desviació estàndard de la intensitat de fluorescència per al píxel i en el període de referència (els primers 30 segons). Per tant, els valors de NFI_{ij} representen la desviació de la intensitat de fluorescència a cada píxel i a cada temps relacionats segons una distribució $N(0, 1)$, i per tant els valors absoluts de fluorescència més grans de 1,96 impliquen una variació significativa d'intensitat de fluorescència respecte el període de referència.

Assajos de transferència d'energia bioluminiscent per ressonància (BRET).

Per als assajos de BRET, les cèl·lules s'han sembrat en plaques de 6 pous i han estat transfectades amb les quantitats indicades dels cDNA corresponents a les proteïnes de fusió indicades en cada cas segons els protocols descrits anteriorment. Després de 48 hores les cèl·lules s'han rentat dos cops amb tampó HBSS (*Hank's balanced salt solution*; NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 0,34 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, CaCl_2 1,26 mM, MgSO_4 0,4 mM, MgCl_2 0,5 mM i HEPES 10 mM a pH 7,4) suplementat amb glucosa 0.1% (p/v). Posteriorment, les cèl·lules s'han després de la placa amb un pipeteig suau i s'han resuspès en el mateix tampó. Per a controlar el nombre de cèl·lules, s'ha determinat la concentració de proteïna d'una alíquota de la mostra amb un kit comercial per a l'assaig de Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemanya) utilitzant dil·lucions de BSA com a patró. Per quantificar-ne la fluorescència, les cèl·lules (20 μg de proteïna) s'han distribuït en plaques de 96 pous (plaques negres amb fons transparent) i

la fluorescència s'ha llegit en un fluorímetre Fluo Star Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemanya) equipat amb una làmpada de xenó d'alta energia. La fluorescència del receptor s'ha determinat com a la fluorescència de la mostra menys la fluorescència de les cèl·lules que només expressen la proteïna fusionada a *RLuc*. Per a les mesures de BRET, les cèl·lules s'han distribuït (20 µg de proteïna per pou) en plaques blanques de 96 pous (Corning 3600; Sigma, St. Louis, EUA) i s'hi ha afegit 5 µg de coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, EUA). Un minut després de l'addició s'han fet les lectures usant un aparell Mithras LB 940 que permet la integració dels senyals detectats pels filtres de longitud d'ona de 485 nm (curta) i de 530 nm (llarga). Per a quantificar la luminiscència deguda al receptor fusionat a *RLuc* s'han realitzat lectures de la placa 10 min després de l'addició de coelenterazina H. El BRET net s'ha definit com a $[Emissió_{530}/Emissió_{485}] - Cf$, on Cf es correspon a $[Emissió_{530}/Emissió_{485}]$ per a les mostres en que s'expressa el constructe amb *RLuc* sol en el mateix experiment. El BRET s'ha representat en miliunitats de BRET (mBU; BRET net x 1000). A la Figura 1 es representa l'esquema d'aquest procés.

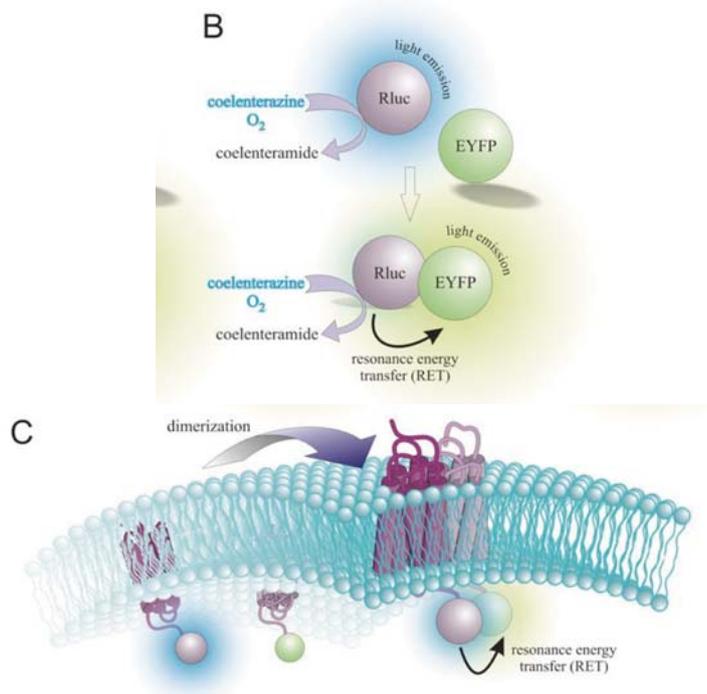


Figura 1. Representació esquemàtica del fenomen de BRET. El fenomen de BRET ocorre quan la molècula donadora (*RLuc*) és suficientment propera a la molècula acceptora (en aquest cas EYFP). En el cas que aquestes dues molècules es trobin a una distància de menys de 10 nM, la llum emesa com a conseqüència de l'oxidació de la coelenterazina catalitzada per *RLuc*, pot excitar la molècula fluorescent EYFP i detectar-se'n la llum emesa a la seva longitud d'ona característica. Si les molècules no són prou properes, i no es dona el fenomen de BRET, només es detectarà llum a la longitud d'ona emesa per *RLuc*. Quan aquestes dues proteïnes es troben fusionades a dos receptors, la detecció de BRET ens permet estudiar-ne la dimerització. *Modificat de Pfleger i Eidne, 2005.*

Assajos de BRET amb complementació molecular.

Els experiments de BRET amb complementació bimolecular de bioluminescència i fluorescència (BRET amb BiLFC) s'han realitzat seguint el protocol anterior amb la salvetat de que els receptors d'interès s'han fusionat a les meitats N-terminal o C-terminal de les proteïnes bioluminescents o fluorescents truncades: *nRLuc8* (corresponent als residus aminoacídics de la part N-terminal 1-229 de *RLuc8*) i *cRLuc8* (corresponent a la part C-terminal, residus 230-311) i *nVenus* (corresponent a la part N-terminal de YFP Venus, residus 1-155) i *cVenus* (corresponent a la part C-terminal de YFP Venus, residus 155-238). Si els receptors fusionats a *nRLuc8* i a *cRLuc8* estan suficientment pròxims la proteïna *RLuc8* es reconstitueix de forma activa i pot actuar com un donador de

BRET. Si els dos receptors fusionats a nVenus i a cVenus estan suficientment pròxims la proteïna YFP Venus es reconstitueix i mostra fluorescència amb el que pot actuar com a acceptor de BRET (Fig. 2).

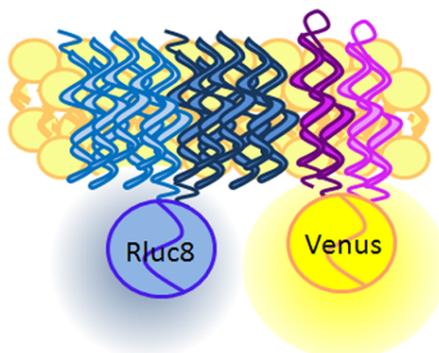


Figura 2. Representació esquemàtica del fenomen de BRET amb complementació molecular. S'observen els receptors fusionats a les dues meitats de la proteïna bioluminiscent *RLuc8* (nRLuc8 i cRLuc8) que si i a les dues meitats de la proteïna fluorescent Venus (nVenus i cVenus). Si els dos receptors que estan fusionats a les meitats de RLuc8 són suficientment propers (a menys de 6 nM), la aquesta proteïna es pot reconstituir i actuar com a un donador de BRET en presència del seu substrat. Si els dos receptors fusionats a les dues meitats de la proteïna Venus són prou propers per reconstituir la proteïna fluorescent, i suficientment a prop dels fusionats al donador hi pot haver una transferència d'energia i donar-se el fenomen de BRET. En aquest cas, s'interpretaria que els 4 receptors formarien part d'un complex tetramèric.

Assajos de transferència seqüencial d'energia per ressonància (SRET)

Els assajos de SRET són una combinació seqüencial dels assajos de BRET i de FRET (veure *Introducció* i Carriba et al., 2008; Fig. 3). En aquests experiments hi participen tres proteïnes que poden emetre llum: la proteïna *RLuc* actua com a donador bioluminiscent, emetent llum a una longitud d'ona que pot ser captada per un acceptor de BRET, en aquest cas la proteïna GFP². Si les dues molècules són prou properes, la llum emesa per GFP² pot ser transferida a una segona molècula fluorescent, que actuaria com a acceptor en un fenomen de FRET, en aquest cas, la proteïna YFP, de la qual s'en podria detectar la llum a la seva freqüència d'emissió (veure Fig. 3). Per aquest sistema, doncs, es podrien detectar interaccions entre 3 receptors diferents. Els experiments de SRET s'han realitzat cotransfectant les cèl·lules amb quantitats constants dels cDNA corresponents a les proteïnes de fusió dels receptors indicats en cada cas amb *RLuc* i GFP² i quantitats creixents del receptor indicat fusionat a la proteïna fluorescent YFP. Després de 48 hores de la transfecció les cèl·lules s'han rentat,

resuspès i se n'ha quantificat la proteïna tal com s'ha descrit per als experiments de BRET. S'ha quantificat la fluorescència deguda al receptor fusionat a YFP distribuïnt les cèl·lules (20 µg de proteïna per pou) en plaques de 96 pous de color negre amb fons transparent i se n'ha llegit la fluorescència amb Fluostar Optima Fluorimeter un filtre d'excitació a 485 nm i dos filtres d'emissió (de 10 nm d'amplitud) a 510 nm (506-515 nm; canal 1) i 530 nm (527-536 nm; canal 2). S'ha mesurat la contribució de les proteïnes GFP² i YFP als dos canals (signatura espectral) en cèl·lules que només expressaven una de les dues proteïnes i s'ha normalitzat a la suma de senyal obtingut en la detecció a les dues longituds d'ona. La fluorescència de la mostra es defineix com la fluorescència descrita prèviament menys la fluorescència de les cèl·lules que només expressen els receptors fusionats a RLuc i a GFP². S'ha determinat l'expressió del receptor fusionat a RLuc mesurant-ne la luminiscència en plaques blanques de 96 pous 10 minuts després de l'addició del seu substrat en un aparell Mithras LB 940. Per a les mesures de SRET, s'han distribuït les cèl·lules en plaques blanques de 96 pous i s'hi ha afegit el substrat DeepBlueC (5µM; Molecular Probes). El senyal de SRET s'ha detectat amb l'aparell Mithras LB 940 amb els filtres de detecció de 400 nm (longitud d'ona curta) i de 500 nm (longitud d'ona llarga). Per analogia amb el BRET, s'ha definit el SRET net com a $[Emissió_{530}/Emissió_{400}] - Cf$, on Cf es correspon a la ratio $[Emissió_{530}/Emissió_{400}]$ en cèl·lules que només els dos receptors fusionats a RLuc i a GFP² i el tercer receptor sense fluoròfor. A la Figura 3 es mostra un esquema del procés de SRET.

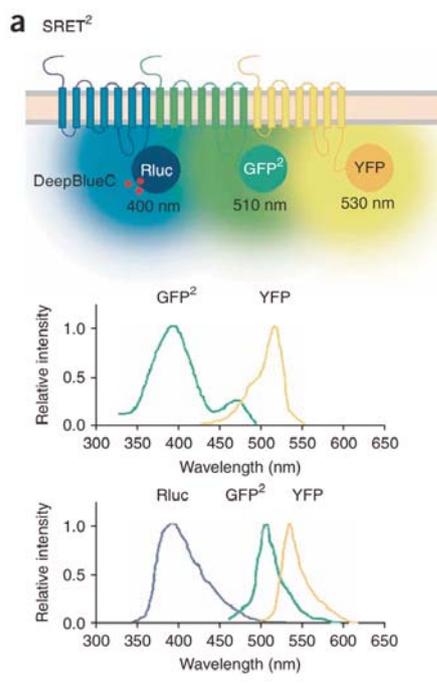


Figura 3. Representació esquemàtica del fenomen de SRET. A la part superior es poden observar les proteïnes de fusió corresponents als receptors que interaccionen entre ells lligats a *RLuc*, *GFP²* i *YFP*, amb els halos de color que representen la llum emesa després de l'addició del substrat de *RLuc*, l'energia de la qual es transferida seqüencialment a les altres proteïnes si els 3 receptors interaccionen. En un primer estadi es dona un fenomen de BRET entre *RLuc* i *GFP²* i en un segon estadi un fenomen de FRET entre la llum emesa per *GFP²* i captada per *YFP*. Els nombres indiquen la longitud d'ona del pic de llum emesa en cada cas. A la part inferior es mostren els espectres d'excitació (dalt) i d'emissió (baix) de les proteïnes de fusió, seguint el mateix esquema de colors. Modificat de Carriba et al., 2008.

Desenvolupament d'animals model de la malaltia de Parkinson

Les rates mascles Sprague-Dawley (Carles River, Itàlia; 275-300 g de pes) han estat engabiades en grups de cinc amb accés lliure a menjar i aigua, amb temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) i cicles de llum fosc de 12 h. S'han seguit les directives de la Comunitat Europea (86/609/EEC; D.L., 27.01.1992, número 116) per als experiments amb animals. Les rates s'han anestesiades amb hidrat de cloral (400 mg/kg i.p.) i s'han situat en un aparell estereotàxic David Kopf on han rebut una injecció unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (8 mg/ 4mL de salí amb 0.05% d'àcid ascòrbic) a les coordenades AP = -2,2, ML = +1,5, DV = -7,8 d'acord amb l'atles de Pellegrino et al. (1979). Passats 17 dies els animals s'han dividit aleatòriament en 3 grups de tractament corresponents a: 1) animals lesionats amb 6-OHDA i que han rebut vehicle (i.p.); 2) animals

lesionats amb 6-OHDA i que han rebut un tractament agut (i.p.) amb L-DOPA (6 mg/kg; aquesta dosi de L-DOPA s'ha vist que indueix rotació contralateral en animals lesionats) i benserazida (6 mg/kg); 3) animals lesionats amb 6-OHDA i que han rebut un tractament subcrònic (i.p.) amb L-DOPA (6 mg/kg) i benserazida (6 mg/kg) durant 3 setmanes, aquest tractament indueix moviments discinètics en els animals lesionats. S'ha determinat el nombre total de rotacions contralaterals dels animals durant 2 h en un sistema rotòmetric automatitzat. En els animals lesionats ha estat 30 vegades superior al dels animals no lesionats. Les rates que no han mostrat com a mínim 300 rotacions contralaterals durant el període de prova han estat eliminades de l'estudi. La lesió nigroestriatal ha estat comprovada immunohistoquímicament per la pèrdua de tinció de la tirosina hidroxilasa (TH; Fig. 4). A més, per confirmar l'entitat de la degeneració nigroestriatal els animals dels grups 2) i 3) han estat testats per les rotacions induïdes per amfetamina 17 dies després de la injecció de 6-OHDA. Els animals que no presentaven com a mínim 100 rotacions per hora s'han descartat. L'increment al llarg del temps en el nombre de rotacions contralaterals (Fig. 5A) i el sorgiment dels típics moviments anormals involuntaris (AIMs; Fig. 5B) s'han trobat en les rates que han rebut el tractament subcrònic. De 6 a 8 hores després de la última injecció de vehicle o L-DOPA (aguda o crònica) els animals s'han sacrificat per decapitació i s'han extret els cervells ràpidament. Els estriats d'ambdós hemisferis (lesionat i no lesionat) han estat disseccionats i congelats a -80 °C fins al moment del seu ús.

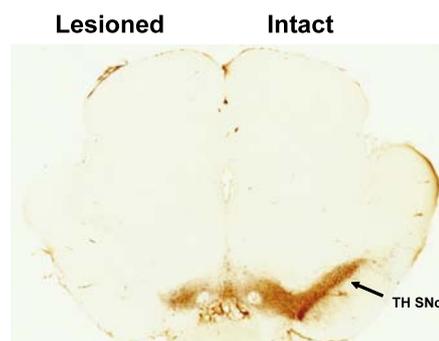


Figura 4. Tinció immunohistoquímica de la TH al cervell de rates lesionades amb 6-OHDA. Per a cada rata la part mesencefàlica del cervell s'ha fixat amb paraformaldehid al 4% durant 3 setmanes. Les seccions coronals que contenen la substància negra *pars compacta* s'han tenyit per l'enzim TH utilitzant un protocol estàndard. A la part esquerra de la imatge s'observa la pèrdua de tinció a l'hemisferi que ha estat injectat amb 6-OHDA.

S'han usat mascles adults i joves de l'espècie *Macaca fascicularis*, la manipulació dels quals s'ha fet segons la directiva de la Comunitat Europea 86/609/EEC així com d'acord amb la Política de la Societat per la Neurociència per a l'Ús

d'Animals per a la Recerca en Neurociència. El disseny experimental ha estat aprovat per al Comitè Ètic per als Estudis amb Animals de la Universitat de Navarra (ref: 018/2008) i pel Departament de Salut del Govern de Navarra (ref: NA-UNAV-04-08). Als animals se'ls ha induït un síndrome parkinsonià bilateral per injecció de la toxina dopaminèrgica MPTP (0.3 mg/kg per setmana fins que han adquirit el síndrome totalment). La severitat del síndrome parkinsonià induït per MPTP ha estat evaluada comportamentalment segons l'escala proposada per Kurlan et al. (1991). Aquesta escala puntua els símptomes motors parkinsonians com l'expressió facial (0-3), el tremolor en repòs (0-3), la manera de caminar (0-2) la bradicinèsia (0-4), la coordinació de l'equilibri (0-2), les habilitats dels membres superiors (0-3) o inferiors (0-3) i la reacció de defensa (0-2) en una escala acumulativa on la màxima puntuació (màxima severitat) és 29. Un cop els primats han aconseguit una puntuació de com a mínim 20 punts, el tractament amb MPTP s'atura per un període de 2 mesos per assegurar que el síndrome parkinsonià s'ha estabilitzat completament. Com a control posterior, un bloc que conté la substància negra *pars compacta* s'ha fixat per immersió i tenyit amb anticossos contra TH per confirmar l'extensió de la mort neuronal induïda per MPTP a les neurones dopaminèrgiques. Per a obtenir els animals discinètics s'ha administrat oralment L-DOPA (25 mg/kg; Madopar levodopa/benserazida, 200:50, Roche, Suïssa) a 3 macacos amb el síndrome parkinsonià estabilitzat. Els canvis en la puntuació de Kurlan et al. (1990) des de la condició de medicació "off" cap a la condició de medicació "on" s'han monitorjat i s'ha calculat la duració de la resposta "on". Les discinèsies induïdes per L-DOPA (LID) s'han qualificat com a 0, quan són absents; 1 quan es presenten només de manera ocasional sota estrès o quan es realitzen activitats motores delicades; 2 per discinèsies presents en la majoria del període "on" però que no interfereixen amb els moviments voluntaris; i 3 (discinèsia severa) quan les discinèsies són contínues, generalitzades i violentes, i pertorben el comportament motor, comprovat tal com s'ha descrit anteriorment (Lanciego et al., 2008). Els animals usats en aquest estudi presentaven discinèsia severa. En tots els casos, els macacos han estat sacrificats per decapitació després d'una sobredosi d'anestèsia terminal T61 (0.3mg/kg). Per als animals discinètics, el T61 se'ls ha administrat quan mostraven manifestament un pic de dosi de les discinèsies. Se'ls ha extret el cervell i les àrees d'interès (nucli caudat i putamens pre- i postcomissural) s'han disseccionat en gel i conservat a -80 °C fins al moment de ser usades. Les estructures disseccionades s'han seleccionat d'acord amb l'atles de Lanciego i Vázquez (2012).

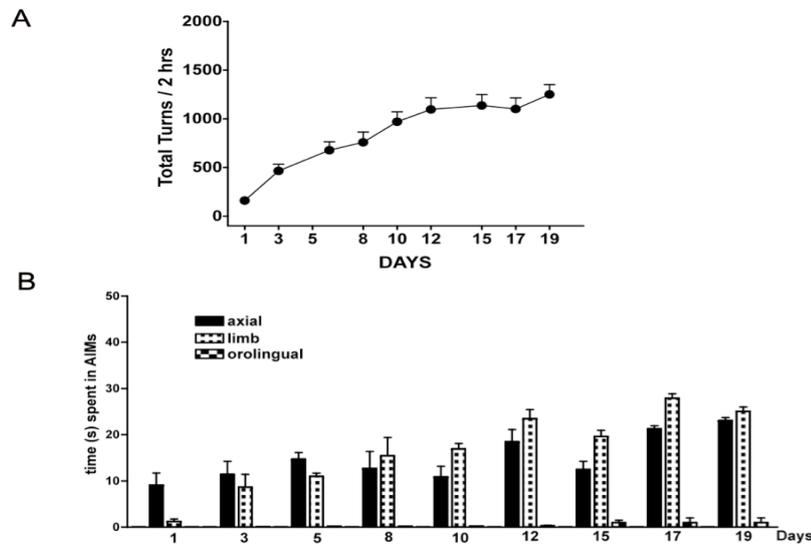


Figura 5. Quantificació de l'increment en el nombre de rotacions contralaterals i de l'emergència dels moviments anormals involuntaris (AIMs). S'ha realitzat la quantificació de les rotacions contralaterals (A) i dels AIMs (B) de les rates lesionades i tractades amb L-DOPA o amb vehicle. Les rotacions contralaterals s'han observat individualment durant un minut cada 20 min en un període total de 120 minuts. D'acord amb la seva distribució topogràfica els AIMs s'han classificat en 3 subtipus: axials (torsió del cap, coll i tronc), de les extremitats (flexions i extensions dels membres anteriors i obrir i tancar de dits) i orolinguals (moviments de la llengua i la mandíbula).

Obtenció de teixit cerebral i preparació de les membranes.

Les mostres de cervell de rata i de cervell de macacos de l'espècie *Macaca fascicularis* s'han obtingut tal com s'ha descrit a l'apartat anterior.

Les mostres de cervell de xai s'han obtingut de l'escorxador local en un lapse de 5 a 10 hores després de la mort de l'animal. L'estriat ha estat disseccionat ràpidament en gel i s'ha guardat a -80°C fins al seu ús.

Les mostres de cervell humà van ser obtingudes per autòpsia a l'Institut Basc de Medicina Legal (Bilbao, Espanya) de subjectes masculins sense historial de desordres neuropatològics o psiquiàtrics i que havien mort sobtadament, majoritàriament per accident de circulació. L'escombratge toxicològic va ser negatiu per tots els subjectes i les mostres de cervell van estar determinades com a histològicament normals. Les mostres de nucli caudat de cada subjecte van ser disseccionades al moment de l'autòpsia, guardades a -70°C i codificades per protegir la identitat dels subjectes. L'interval de temps entre la mort i l'autòpsia (retard postmortem a 4°C) va ser de 26 ± 4 hores. Totes les

mostres de teixit van ser obtingudes d'acord amb els protocols aprovats per el Comitè d'Estudis en Humans de cadascuna de les institucions involucrades.

Les mostres de cervells de ratolins WT (mascles albins Swiss, de 8 setmanes i uns 25 g de pes) i KO per al receptor σ_1 (Langa et al., 2003) han estat proporcionades per Laboratoris Esteve (Barcelona, Spain). Els talls estriatals s'han obtingut tal com s'ha descrit anteriorment (Navarro et al., 2010; Moreno et al., 2011).

En tots els cassos, les suspensions de membranes de teixit cerebral s'han obtingut segons el protocol descrit prèviament (Casadó et al., 1990; Sarrió et al., 2000). El teixit ha estat disgregat amb un homogeneïtzador Polytron (rotor PTA 20 TS, a potència 3; Kinematica, Basilea, Suïssa) dues vegades durant 5 segons, en tampó Tris-HCl 50mM pH 7.4 amb una dilució 1/1000 de còctel d'inhibidors de proteases (Sigma, St Louis, EUA). Un cop eliminades les restes de cèl·lules, la fracció de membranes ha estat separada per centrifugació a $105.000 \times g$ (40 min, 4 °C). Per tal de rentar-les, el sediment ha estat ressuspès i tornat a centrifugar en les mateixes condicions. El sediment ha estat congelat i guardat a -80 °C fins el dia de l'experiment. Abans de l'ús immediat de les preparacions de membranes el sediment s'ha rentat un cop més tal com s'ha descrit anteriorment i s'ha ressuspès en tampó Tris-HCl 50 mM a la concentració adient de proteïna per a cada experiment. La concentració de proteïna s'ha determinat per l'assaig de BCA (Pierce Chemical Co., Rockford, EUA) usant dilucions de BSA com a patró (Pierce Chemical Co., Rockford, EUA).

Obtenció de membranes cel·lulars.

Les membranes de cèl·lules CHO s'han obtingut a partir de plaques de 150 cm^2 de cèl·lules crescudes i transfectades o no tal com s'ha descrit anteriorment. Quan les cèl·lules han arribat a una confluència del 80-90% s'han escrapejat i rentat dos cops en tampó PBS pH 7,4, s'han resuspès en 10 volums de tampó Tris-HCl 50 mM pH 7,4 a 4 °C amb una dilució 1/100 del còctel d'inhibidors de proteases i s'ha procedit tal com s'ha descrit anteriorment per a les membranes de teixit cerebral.

Assajos d'unió de radiolligands.

Per als assajos de competició, les suspensions de membranes (a una concentració de 0,25 a 0,5 mg de proteïna/ml, segons s'indiqui) han estat incubades, en un període de 1 a 3 hores a 25 °C en tampó Tris-HCl, pH 7.4, amb 10 mM de MgCl₂ i 0,2 U/ml d'adenosina desaminasa (ADA, EC 3.5.4.4; Roche, Basilea, Suïssa; només en els experiments en que es veu implicat el receptor A_{2A} d'adenosina), amb la concentració indicada del lligand marcat radioactivament i concentracions creixents del lligand competidor en un rang en que es desplaça tota la unió específica del lligand radioactiu. La unió inespecífica s'ha determinat en presència del mateix lligand radioactiu sense marcar i s'ha confirmat que el valor coincideix amb el calculat per extrapolació de les corbes de competició. En els experiments en els que s'analitza l'efecte d'un modulador alostèric sobre la unió dels lligands s'han preincubats les membranes amb aquestes molècules en el mateix tampó durant un període de 30 a 90 minuts abans de la incubació del lligand radioactiu.

El lligand lliure i l'unit a membrana s'han separat per filtració d'aliquotes de 500 µl a través de filtres de fibra de vidre (Whatman GF/C, Gaithersburg, EUA) tractats amb polietilènimina (PEI) al 0,3% durant una hora, excepte quan s'indica explícitament el contrari, utilitzant un equip *Brandel Cell Harvester* (Gaithersburg, USA). Després de rentar-los durant 5 segons amb tampó Tris-HCl a 4 °C, els filtres han estat incubats en 10 ml de còctel de centelleig Ecoscint H (National Diagnostics, Atlanta, EUA) durant tota una nit en agitació i preservats de la llum (Casadó et al., 1990; Casadó et al., 1992) i la radioactivitat dels vials ha estat determinada amb un comptador Packard 1600 TRI-CARB (Downers Grove, EUA) amb una eficiència del 62% pel triti (Sarrió et al., 2000).

Per als assajos de dissociació, les suspensions de membranes s'han incubat en tampó Tris-HCl, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM i la concentració indicada de lligand radioactiu. Després de dues hores, la dissociació s'ha iniciat per addició d'una concentració adient dels lligands no-marcats indicats. A cada lapse de temps indicat (entre 0 i 420 min) s'ha separat el radiolligand unit a membrana del lliure i se n'ha mesurat la radioactivitat pel procés descrit anteriorment per als experiments de competició. La unió no específica s'ha mesurat després de dues hores d'incubació en presència d'un excedent de lligand fred.

Anàlisi dels experiments de competició.

Les corbes de competició han estat analitzades per regressió no lineal usant el programa comercial Grafit (Erithacus Software, Surrey, UK), ajustant les dades al *two-state dimer receptor model* (Franco et al., 2005; 2006), emprant la següent equació (Eq. 1), útil per calcular les constants macroscòpiques de dissociació a l'equilibri:

$$A_{unit} = \frac{(K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB})R_T}{K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B/K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B^2/(K_{DB1}K_{DB2})} \quad (\text{Eq. 1})$$

On A representa la concentració de lligand A radioactiu, R_T és la quantitat total de dímers del receptor, i K_{DA1} i K_{DA2} són les constants d'equilibri macroscòpiques que descriuen les entrades de la primera i la segona molècula de lligand A al receptor dimèric, respectivament; B representa la concentració del lligand competidor i K_{DB1} i K_{DB2} són, respectivament, les constants d'equilibri macroscòpiques de la primera i la segona unió de B; K_{DAB} és la constant d'equilibri híbrida i que descriu la unió d'una molècula B a un receptor dimèric semioocupat per A.

Com que la majoria de lligands A mostren un comportament no cooperatiu, l'Eq. 1 es pot simplificar cap a la Eq. 2, degut a que en aquest cas $K_{DA2} = 4K_{DA1}$ (veure Casadó et al., 2007):

$$A_{unit} = \frac{(K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB})R_T}{4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB} + 4K_{DA1}^2B/K_{DB1} + 4K_{DA1}^2B^2/(K_{DB1}K_{DB2})} \quad (\text{Eq. 2})$$

Amb aquests paràmetres es pot calcular l'índex de cooperativitat per al lligand B (veure Casadó et al. 2007; Eq. 3):

$$D_{CB} = \log\left(\frac{4K_{DB1}}{K_{DB2}}\right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Una informació útil és la concentració de B que proporciona la semisaturació del receptor dimèric (B_{50}) i s'obté amb un càlcul directe a partir de l'Eq. 4:

$$B_{50} = (K_{DB1}K_{DB2})^{1/2} \quad (\text{Eq. 4})$$

En algunes condicions experimentals, ambdós lligands A i B no mostren cooperativitat ($K_{DA2} = 4K_{DA1}$ i $K_{DB2} = 4K_{DB1}$), en aquests casos l'Eq. 1 és simplificada de la següent manera:

$$A_{unit} = \frac{(4K_{DA1}A + 2A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB})R_T}{4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB} + 4K_{DA1}^2B/K_{DB1} + K_{DA1}^2B^2/K_{DB1}^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Un cas particular de les condicions experimentals anteriors és quan el radiolligand A i el lligand B són el mateix compost i la unió és no-cooperativa, en aquest cas l'equació anterior es pot simplificar a:

$$A_{unit} = \frac{(4K_{DA1}A + 2A^2 + AB)R_T}{4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + AB + 4K_{DA1}B + B^2} \quad (\text{Eq. 5b})$$

En alguns casos, per comparar-los, s'han ajustat les dades al model clàssic d'un lloc d'unió si les corbes eren monofàsiques, o al model que considera dos llocs d'unió independents en el cas de les corbes bifàsiques, usant respectivament, les equacions següents:

$$A_{unit} = \frac{IC_{50}R}{IC_{50} + B} \quad (\text{Eq. 6})$$

$$A_{unit} = \frac{IC_{50H}R_H}{IC_{50H} + B} + \frac{IC_{50L}R_L}{IC_{50L} + B} \quad (\text{Eq. 7})$$

on R, R_H i R_L són la unió específica en absència de lligand competidor. IC_{50} , IC_{50H} i IC_{50L} del compost B estan relacionades amb les seves respectives constants d'equilibri K_D , K_{DH} i K_{DL} d'acord amb l'equació de Cheng i Prusoff (Cheng i Prusoff, 1973):

$$IC_{50H} = K_{DH}(1 + A/K_{DA}) \quad IC_{50L} = K_{DL}(1 + A/K_{DA}) \quad (\text{Eq. 8})$$

La qualitat de l'ajust s'ha valorat a partir del valor de X^2 reduït donat pel programa de regressió no lineal. La prova de significança per dues poblacions de variàncies obtingudes per dos models diferents està basada en una distribució F. Usant el test F, una probabilitat més gran del 95% ($p < 0.05$) ha estat el criteri per seleccionar un model més complex (cooperativitat sobre no cooperativitat, o dos llocs d'unió enlloc d'un) per sobre d'un de més simple. Els

resultats es donen (si no s'indica el contrari) com el valor del paràmetre \pm SEM de tres experiments independents.

Assajos de co-immunoprecipitació.

Les membranes de teixit cerebral o de cèl·lules s'han obtingut tal com s'ha descrit anteriorment i s'han solubilitzat en tampó d'immunoprecipitació (PBS pH 7,4 amb 1% (v/v) de Nonidet P-40) refredat en gel, s'han incubat durant 30 min en gel i s'han centrifugat a 105.000 g durant 1 h a 4 °C. El sobrenedant (1 mg/ml de proteïna; quantificada segons el mètode del BCA descrit anteriorment) s'ha processat tal com descriu el protocol del fabricant del kit (Dynabeads® Protein G kit, Invitrogen, Paisley, Regne Unit) usant els anticossos indicats en cada cas. Els immunoprecipitats s'han separat en una electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida amb SDS 10%, s'han transferit a membranes de PVDF per *western blot*. Les membranes s'han bloquejat en tampó de bloqueig (PBS amb 5% de llet i 0,05 % (v/v) de Tween 20) durant 90 min a temperatura ambient i s'han incubat amb els anticossos primaris corresponents diluïts en tampó de bloqueig durant tota la nit a 4 °C. Després de rentar les membranes 3 vegades durant 10 min amb tampó PBS amb Tween 20 (0,05 %), s'han incubat amb els anticossos secundaris corresponents diluïts en el tampó de bloqueig durant 1 hora a temperatura ambient. Després de 3 rentats durant 10 min amb PBS amb Tween-20 0,05% i d'un rentat final amb PBS les bandes s'han detectat amb l'addició del substrat quimioluminiscent SuperSignal West Pico (Pierce) i visualitzat amb un aparell LAS-3000 (Fujifilm). L'anàlisi de les bandes detectades s'ha realitzat amb els softwares Image Gauge (v. 4,0) i Multi Gauge (v. 3,0) de Fujifilm.

Assajos in situ de lligació per proximitat (PLA).

Els talls de teixit estriatal de ratolí (WT o KO pel receptor σ_1) es van obtenir tal com hem descrit anteriorment (Navarro et al 2010, Moreno et al., 2011). Per a aquests experiments s'han usat, també, seccions parasagitals (de 40 μ m de gruix) fixades en paraformaldehid del caudat i putamen de l'espècie *Macaca fascicularis* procedents del laboratori del Dr. J.L. Lanciego de l'institut CIMA de la Universitat de Navarra. La detecció d'heteròmers entre dos receptors diferents s'efectua utilitzant el *Duolink II in situ PLA detection kit* (Olink, Bioscience,

Uppsala, Suècia; Fig. 6). Els talls s'han rentat amb tampó TBS (Tris-Hcl 50 mM pH 7.8 amb NaCl 0.9%), i permeabilitzat amb tampó TBS amb 0,01 % de Triton X-100 durant 10 min i successivament rentat amb TBS. Després d'una hora d'incubació a 37 °C amb la solució de bloqueig del kit en una cambra humida preescalfada, els talls s'han incubat durant tota la nit amb els anticossos primaris indicats en cada cas dil·luïts en el medi de dil·lució del kit. Seguidament els talls s'han rentat tal com indica el fabricant i s'han incubat durant dues hores en una cambra humida a 37 °C amb les sondes de PLA que detecten anticossos de conill o de ratolí (*Duolink II PLA probe anti-mouse plus* i *Duolink II PLA probe anti-rabbit minus*) preparades en el diluent proporcionat pel fabricant a una dil·lució 1:5. En els casos en que no es disposa d'anticossos d'espècies diferents adequats per a aquesta tècnica, s'han acoblat directament els anticossos primaris a les cadenes de DNA "més" i "menys", seguint les instruccions del fabricant. Després dels rentats a temperatura ambient, les mostres s'han incubat en una cambra humida a 37 °C durant 30 min amb la solució de lligació (Duolink II Ligation 1:5 amb Duolink II Ligase 1:40). S'han incubat amb el reactiu d'amplificació Duolink II Amplification (1:5) amb la polimerasa proporcionada pel fabricant (1:80), durant 100 min a 37 °C, aquest reactiu ja conté les sondes d'oligonucleòtids conjugades a un fluoròfor vermell (pics d'excitació a 598 nm i d'emissió a 634 nm). Després d'un rentat exhaustiu a temperatura ambient els talls s'han montat en medi de montatge amb DAPI, proporcionat pel fabricant. Les mostres s'han observat en un microscopi confocal Leica SP2. S'han quantificat les cèl·lules que contenen una o més taques vermelles en front del total de cèl·lules (nuclis blaus) i s'ha determinat la relació r (número de taques vermelles / de cèl·lules que contenen taques) considerant de 150 a 200 cèl·lules de 3 camps diferents utilitzant el programa desenvolupat pels serveis de microscòpia de la Universitat de Barcelona. A la Fig. 6 es mostra una representació esquemàtica de la tècnica

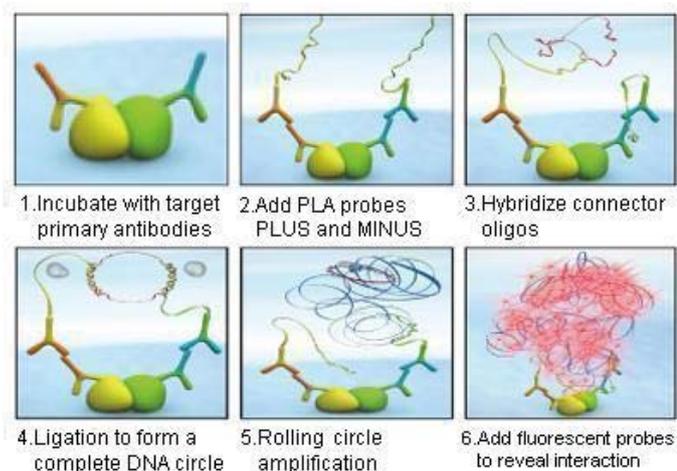


Figura 6. Representació esquemàtica de la tècnica de PLA. Representació esquemàtica de la tècnica de PLA en que un cop s'han unit els anticossos primaris, s'uneixen els anticossos secundàries conjugats a les sondes de DNA PLUS i MINUS, que s'hibriden amb els nucleòtids connectors i es poden amplificar un cop lligats en presència d'oligonucleòtids fluorescents.

Assajos de senyalització en cèl·lules o en talls de teixit estriatal.

Per a la determinació de la fosforilació d'ERK 1/2, els talls estriatals de ratolí han estat obtinguts tal com s'ha descrit anteriorment i s'han tractat amb agonistes i/o antagonistes dels receptors tal com s'indica en cada cas seguint el protocol previament descrit (Navarro et al., 2010; Moreno et al., 2011). Després s'han congelat amb gel sec i s'han guardat a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins al moment de la determinació. Quan s'empren cèl·lules, aquestes, plaquejades en flascons de 25 cm^2 , han estat transfectades transitòriament amb el corresponent cDNA (de 0,5 a $2\text{ }\mu\text{g}$, segons s'indiqui). Han estat mantingudes en medi sense sèrum les 16 hores abans de l'assaig i han estat tractades amb els lligands indicats (de 2 a 20 min). Posteriorment, les cèl·lules o els talls estriatals s'han rentat amb tampó PBS refredat en gel i s'han lisat en tampó de lisi a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (50 mM Tris-HCl pH 7,4 amb NaF 50 mM, NaCl 150 mM, β -glicerofosfat 45 mM, Triton X-100 a l'1%, òxid de fenilarsina (PAO) $20\text{ }\mu\text{M}$, NaVO_4 0,4 mM i còctel d'inhibidors de proteases a l'1%). La fosforil·lació de ERK 1/2 s'ha determinat per *western blot* i immunodetecció tal com s'ha descrit prèviament (Navarro et al., 2010; Moreno et al., 2011).

Per a la determinació de cAMP, les cèl·lules CHO transfectades o no s'han tractat segons s'indica en cada cas i la producció de cAMP s'ha determinat amb un kit de determinació radioactiu ($[^3\text{H}]\text{cAMP}$; Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia) seguint les intruccions del fabricant.

Per analitzar l'activació de les proteïnes G directament s'ha emprat el sistema CellKey (Molecular Devices, Sunnyvalley, EUA) que proporciona una plataforma d'assaig universal i sense marcatge que usa l'espectroscopia cel·lular dielèctrica (CDS) en temps real per a mesurar l'activació de receptors, ja siguin endògens o transfectats (Schroder et al., 2011). En aquesta tècnica es mesuren els canvis en la impedància (DZ o dZ) d'una monocapa de cèl·lules com a resposta a l'activació d'un receptor. La impedància (Z) es defineix, segons la llei d'Ohm, com el quocient entre el voltatge i la intensitat de corrent ($Z = V / I$). Les cèl·lules s'han fet créixer fins a la confluència en plaques de 96 pous CellKey Standard que contenen els electrodes al fons de cada pou. El dia abans de la determinació les cèl·lules s'han incubat o no amb els inhibidors de proteïna G indicats en cada cas. S'ha canviat el medi de les cèl·lules per tampó HBSS (Gibco, Paisley, Regne Unit) suplementat amb HEPES 20 mM 30 min abans de l'experiment. S'ha enregistrat una línia basal durant 5 minuts i les cèl·lules s'han tractat amb concentracions creixents dels lligands indicats i s'ha seguit adquirint dades durant 10 minuts. Per calcular la impedància s'apliquen petits voltatges a 24 freqüències diferents. A baixa freqüència, s'indueixen les corrents extracel·lulars (iec) que passen al voltant de les cèl·lules de la capa (Fig. 7). A alta freqüència, s'indueixen les corrents transcel·lulars (itc) que penetren a la membrana cel·lular (Fig. 7). Les dades que es representen es corresponen a la màxima impedància de corrents extracel·lular (Z_{iec}) en resposta a l'addició de lligands, i segons la forma d'aquesta corba i en comparació amb les corbes patró es pot deduir a quin tipus de proteïna G estan acoblats els receptors estudiats.

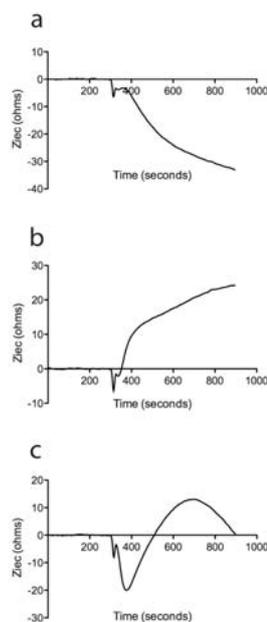
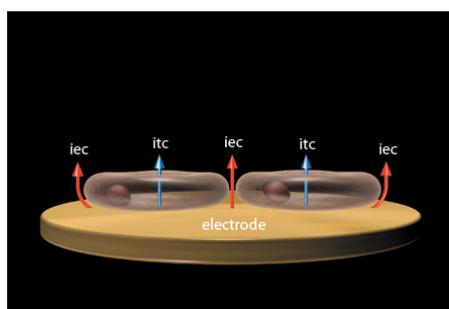


Figura 8. Representació esquemàtica de l'assaig CellKey. Representació esquemàtica d'una monocapa cel·lular i de les corrents extracel·lulars (iec) i transcel·lulars que hi circulen (part superior). A la part inferior es mostren els perfils típics de resposta associats a les proteïnes G_s (a), G_i (b), i G_q (c). Aquests perfils s'han determinat amb cèl·lules HEK-293 transfectades de manera estable amb el receptor d'adenosina A_{2A} acoblat a proteïna G_s (a), el receptor d'adenosina A_1 acoblat a proteïna G_i (b) o amb cèl·lules no transfectades que expressen constitutivament el receptor de trombina acoblat a proteïna G_q (c). Els canvis en la impedància s'han mesurat després de l'activació amb l'agonista del receptor A_{2A} CGS2160 10 nM, amb l'agonista del receptor A_1 CPA 10 nM (b) o amb trombina 50 nM (c). La forma de les representacions és consistent amb els resultats esperats per a cadascuna de les proteïnes G.

IV. RESULTATS I DISCUSSIÓ



CAPÍTOL 1

Estudi de la Dinàmica del Receptor D₂ de Dopamina Mitjançant la Microscòpia Confocal de Disc Giratori.

Els GPCR són dianes clau en el desenvolupament de nous fàrmacs, agonistes i antagonistes, i de fet, aproximadament el 50% dels fàrmacs en ús actuen sobre GPCR. Conèixer el moviment i el tràfic dels receptors a nivell de membrana és crucial per entendre el funcionament i la funció dels GPCR. L'estudi de la dinàmica del receptor ha avançat significativament amb l'ús de proteïnes de fusió fluorescents unides al receptor i la microscòpia de fluorescència. En efecte, el recent desenvolupament de la tècnica de microscòpia confocal de disc giratori (*spinning disk confocal microscopy*) proporciona una alta resolució a baixos nivells d'il·luminació, de manera que s'evita el dany al fluoròfor o la toxicitat d'aquest quan s'estudien cèl·lules vives (Wang et al., 2005). Per tant, aquesta tècnica permet una visió directa, en temps real, i ofereix l'oportunitat d'observar proteïnes marcades amb emissors de fluorescència amb una pertorbació cel·lular mínima (Inoué i Inoué, 2002).

Tal com s'ha comentat anteriorment, la transmissió dopaminèrgica està mitjançada pels receptors de dopamina i està involucrada en activitats neurals clau, controlant la locomoció, l'addicció, el coneixement, l'aprenentatge o les funcions de memòria (El-Ghundi et al., 2007). Més concretament, la desregulació de la senyalització per dopamina és un element fonamental per entendre els símptomes clínics de la malaltia de Parkinson (PD) i l'esquizofrènia, i actualment s'usen agonistes i antagonistes d'aquests receptors per al tractament d'aquestes malalties (LeWitt et al., 2008; Lieberman et al., 2008). Una manera de modular la força sinàptica d'un determinat neurotransmissor és regular-ne el nombre de receptors en localitzacions neuronals específiques (Dumoulin et al., 2009), i el nombre de receptors a la

membrana depèn de la seva inserció, la difusió lateral i de l'endocitosi. Els mètodes òptics actuals per estudiar les dinàmiques dels receptors a la superfície cel·lular, com el FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) estan limitats pel fet que involucren sistemes confocals d'escaneig en un sol punt i en aquests hi ha una decoloració ràpida o fototoxicitat (Dobrucki et al., 2007).

L'objectiu d'aquest capítol, que es correspon amb l'Objectiu 1 d'aquesta Tesi és desenvolupar un mètode que permeti caracteritzar la dinàmica del receptor a la membrana utilitzant la microscòpia confocal de disc giratori, i s'ha utilitzat com a model la isoforma llarga del receptor de dopamina D_{2L}.

Els resultats d'aquest capítol es troben publicats a **Real-Time G-Protein Coupled Receptor Imaging to Understand and Quantify Receptor Dynamics** per Aymerich MS., López-Azcárate, J., Bonaventura, J., Navarro, G., D. Fernández-Suárez, D., Casadó V., Mayor F., Luís C., Valencia M., Artieda J. i Franco, R. *The Scientific World JOURNAL* vol. 11, pp. 1995–2010, 2011.

1.1 Mesura de la fluorescència de la membrana plasmàtica.

Les cèl·lules HEK-293 s'han cultivat i transfectat tal com s'indica a l'apartat de *Materials i Mètodes* amb el cDNA (de 0.5 a 1 µg) corresponent a la proteïna de fusió D_{2L}-YFP, resultant d'unir el cDNA del receptor D_{2L} de dopamina humana al plasmidi pEYFP-N1 (Clontech, Mountain View, EUA). L'expressió i la funcionalitat de la proteïna de fusió s'han comprovat per microscòpia confocal (veure més endavant) i per la determinació dels nivells de AMPc i de fosforilació d'ERK1/2 (Canals et al., 2003). A la figura 1 es mostra com la fusió a YFP no afecta significativament a la funcionalitat del receptor D₂ en les cèl·lules HEK-293 transfectades amb els cDNA del receptor D_{2L} humana i de D_{2L}-YFP, que 48 hores després de la transfecció han estat activades amb l'agonista del receptor D₂ quinpirol (Tocris, Ellisville, EUA) 100 nM durant 5 minuts.

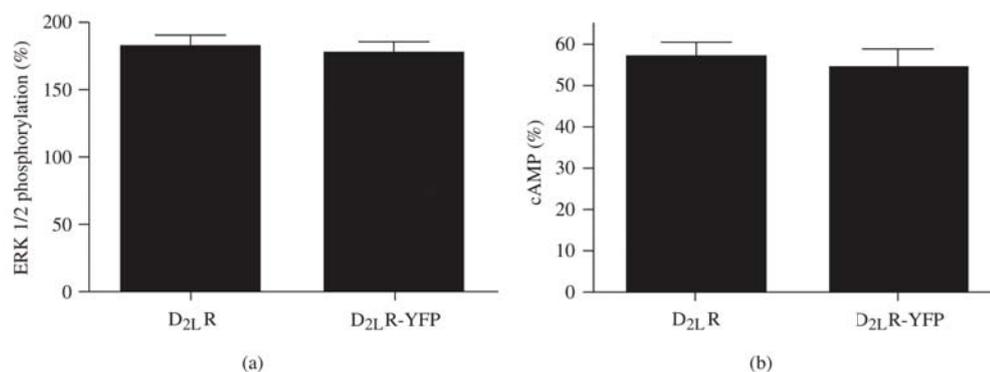


Figura 1. Caracterització funcional de la proteïna de fusió D_{2L}-YFP. Les cèl·lules HEK-293 s'han transfectat transitòriament amb 1 µg del cDNA corresponent a D₂ o a D_{2L}-YFP i s'han usat 48 hores després de la transfecció. Al panell (a) es mostren els nivells de fosforilació de ERK 1/2 en les cèl·lules tractades amb quinpirole (100 nM) durant 5 min respecte al de les cèl·lules tractades amb vehicle. Al panell (b) es mostren els nivells de cAMP en cèl·lules tractades amb forskolina 3 µg i en presència o en absència de 100 nM de quinpirole (es mostren els % respecte als tractaments amb forskolina). Els valors corresponen a les mitjanes ± SEM de tres experiments realitzats per duplicat.

L'expressió de D_{2L}-YFP s'ha visualitzat directament a les cèl·lules vives utilitzant un microscopi confocal de disc giratori. S'ha adquirit un apilament d'imatges a una magnificació de 63x i la localització de D_{2L}-YFP s'ha analitzat píxel a píxel. S'ha seleccionat per a l'anàlisi un pla de l'apilament corresponent a la porció del mig de cada cèl·lula (Fig. 2a), se n'ha seleccionat el contorn de la membrana plasmàtica (Fig. 2b) i s'ha mesurat la fluorescència produïda per D_{2L}-YFP en l'àrea marcada a la Fig. 2c. Les mesures de fluorescència s'han realitzat en intervals regulars (360 determinacions al llarg de 6 min) en aquesta àrea al llarg del control de la membrana i es mostren a la Fig 2d. S'ha corregit el defalliment de la intensitat de fluorescència degut a la exposició repetitiva al làser tal com es descriu a la secció de *Materials i mètodes*. Les intensitats inicials de fluorescència defalleixen més ràpidament comparats amb els píxels que inicialment mostren menys intensitat, com que el fotobleueig (*photobleaching*) depèn de la intensitat inicial s'ha computat una funció biexponencial per a tots els píxels de la membrana plasmàtica (Fig. 3b). Un exemple de l'evolució temporal de la intensitat de la fluorescència en un sol píxel amb fotobleueig, el seu ajust a una funció biexponencial i els valors corregits es poden observar a la Fig 3c. Significativament, els paràmetres resultants de l'ajust de les dades són similars tant en les cèl·lules no tractades com en les tractades amb l'agonista del receptor D₂ quinpirole (test-U de Mann-Whitney, $P < 0.05$) tal com és evident en el gràfic que mostra la fluorescència corregida i no corregida en diferents temps puntuals (Fig. 3d). Per tot això es demostra la robustesa del procediment utilitzat per corregir el defalliment de la fluorescència.

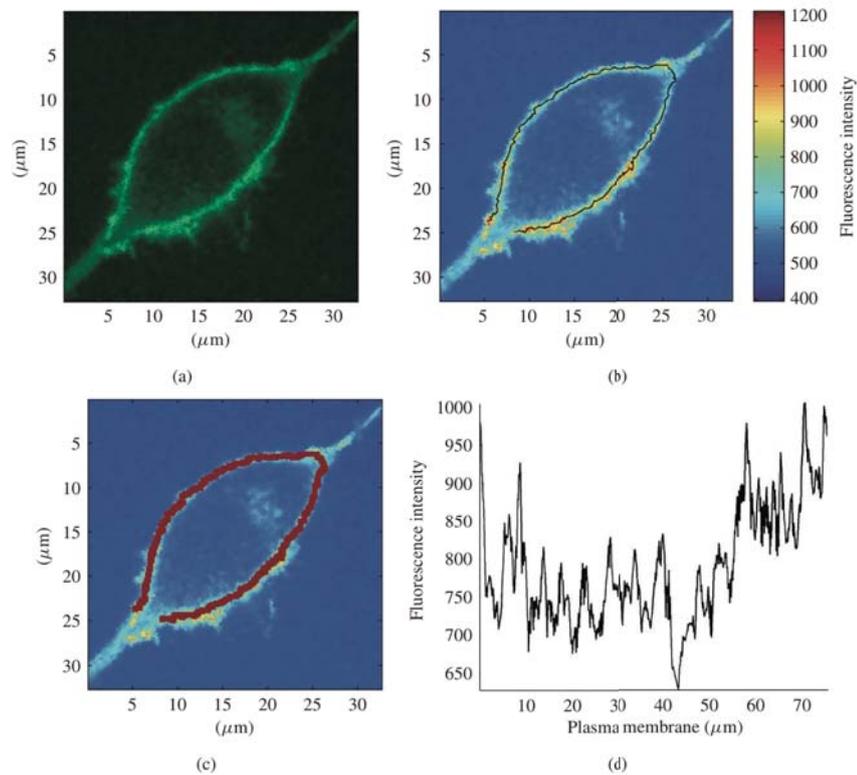


Figura 2. Mesura de la intensitat de fluorescència a la membrana a temps puntuals. S'ha capturat un apilament d'imatges de les cèl·lules que expressen D_{2L}-YFP i s'ha seleccionat un pla per a l'anàlisi (a). S'ha traçat una línia d'un píxel d'amplada al llarg de la membrana cel·lular recorrent els punts de màxima intensitat de fluorescència (b). Al panell (c) es mostra una àrea de 5 x 5 píxels al voltant de cada un d'aquests punts. I a (d) es mostra una representació lineal de la mesura mitjana de la intensitat de la fluorescència en cada punt del contorn de la membrana plasmàtica.

1.2 Enregistrament d'imatges del receptor D₂ a la superfície cel·lular.

Amb els mètodes descrits anteriorment s'ha estudiat el moviment del receptor D₂ a la superfície cel·lular provocat per l'addició d'un agonista. Després de 30 s de començar l'enregistrament s'ha afegit l'agonista del receptor D₂ quinpirole (o només el vehicle en les mostres control), i per tant els 30 primers segons de cada experiment poden ser utilitzats com a referència per a la normalització. El defalliment de la fluorescència a la membrana plasmàtica en les cèl·lules control o tractades amb quinpirole (Fig 4a i 4d) s'ha normalitzat segons el model biexponencial (Fig. 4b i 4e) i s'han avaluat canvis quantitius en la intensitat de la fluorescència corregida al llarg del temps a cada localització de la membrana (Fig. 4c i 4f). S'han detectat tant increments (punts vermells) com decrements (punts blaus) en la intensitat de la fluorescència de les cèl·lules tractades amb quinpirole (Fig. 4f). La fluorescència de cada píxel s'ha normalitzat a cada temps

fent servir les dades obtingudes en el període previ a l'addició de l'agonista (els primers 30 segons; Fig. 4g). No s'han detectat canvis en la quantitat acumulada de fluorescència a la membrana tant en les cèl·lules control com en les tractades amb quinpirole (Fig 4h; $P < 0,05$, veure *Materials i mètodes*), aquest fet indica que la quantitat neta de D_{2L}-YFP a la superfície cel·lular s'ha mantingut constant. Els canvis en la intensitat de fluorescència es poden atribuir al moviment lateral dels receptors en la membrana plasmàtica. Els píxels corresponents a D_{2L}-YFP s'han mogut a una velocitat de $0,086 \pm 0,004 \mu\text{m/s}$ en presència de l'agonista o a $0,080 \pm 0,006$ en les cèl·lules control. La fracció mòbil de receptor mesurada 180 s després del tractament ha estat del $14 \pm 3\%$ o del $6 \pm 2\%$ en les cèl·lules tractades amb quinpirole o amb vehicle, respectivament. Agafats en conjunt, aquests resultats indiquen que el tractament amb l'agonista incrementa la fracció mòbil del receptor, però que no té efecte en la velocitat d'aquest moviment (Fig. 4i).

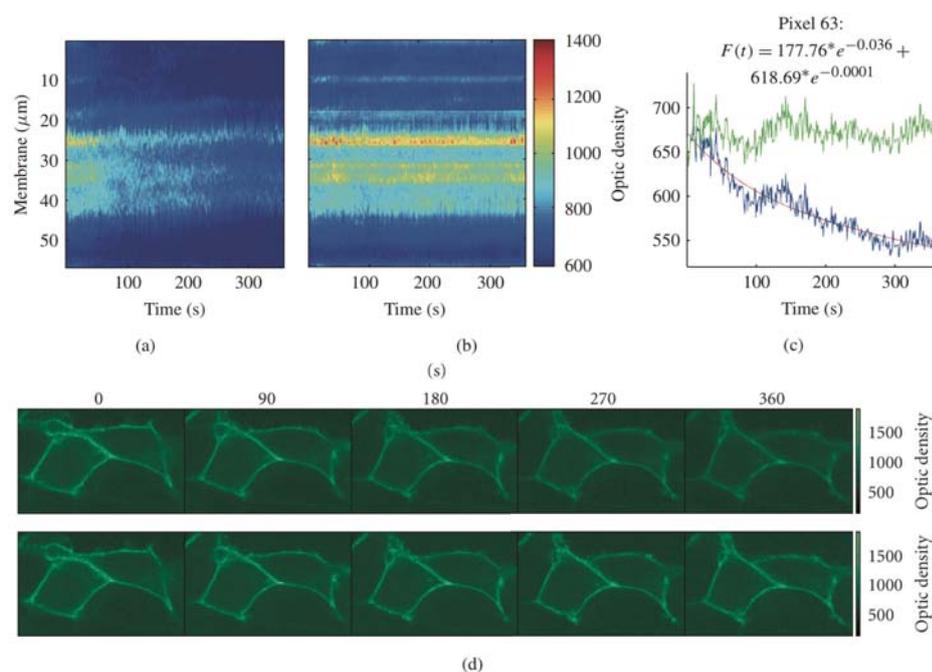


Figura 3. Correcció del fotoblanqueig. S'ha enregistrat una imatge de les cèl·lules HEK-293 transfectades amb D_{2L}-YFP durant cada segon durant 6 min. S'ha seleccionat un pla per a l'anàlisi i s'ha mesurat la intensitat de fluorescència de la membrana plasmàtica a cada temps. L'efecte del defalliment de la intensitat de la fluorescència a la membrana plasmàtica és clarament visible degut a la repetitiva exposició al làser (a). L'efecte de fotoblanqueig s'ha corregit en cada imatge per a cada píxel utilitzant una equació biexponencial (b). Al panell (c) es mostra l'evolució temporal de la fluorescència d'un píxel (blau) i el seu defalliment biexponencial (vermell). L'equació biexponencial indicada s'ha utilitzat per corregir el valor de la intensitat d'aquest píxel al llarg del temps (verd). Al panell (d) es mostren els resultats gràfics de la correcció, mostrant les imatges abans de ser corregides (fila superior) o després (fila inferior); cal notar que el defalliment només és visible a la fila superior.

Utilitzant l'adquisició d'imatges en viu també s'ha estudiat el tràfic vesicular del receptor D_{2L}-YFP a les cèl·lules HEK-293 analitzant el moviment intracel·lular de D_{2L}-YFP en imatges d'un apilament de plans. El senyal de fluorescència s'ha valorat en un apilament de 4 µm d'imatges en què s'observen les vesícules intracel·lulars que tenen D_{2L}-YFP (Fig 5a i 5d) en dues cèl·lules diferents. Les vesícules s'han seleccionat i seguit durant l'experiment (de 1 a 3 vesícules per cèl·lula, seguides durant 360 s) i les coordenades de cada vesícula en cada punt de l'experiment s'han comparat amb les seves coordenades del punt anterior (Fig. 5b i 5e). La distància recorreguda per cada vesícula amb D_{2L}-YFP pot ser calculada per la desconvolució de les seves coordenades (Fig 5c i 5f). La distància mitjana recorreguda per les vesícules de les cèl·lules exposades a quinpirole ha estat de $97 \pm 3 \mu\text{m}$ (n = 17), similar a la recorreguda en les cèl·lules control $98 \pm 4 \mu\text{m}$ (n = 23) (Fig. 5g). En una anàlisi ANOVA unidireccional no s'han trobat diferències significatives en la distància recorreguda per les vesícules de cada grup, la qual cosa indica que l'agonista no afecta significativament el tràfic intracel·lular a curt termini (6 min) de les vesícules que contenen el receptor D_{2L}-YFP.

Quan s'han caracteritzat les vesícules que contenen D_{2L}-YFP, han colocalitzat clarament amb el marcador de l'aparell de Golgi GM-130 i el marcador endosomal transferrina, i no han colocalitzat amb el marcador de lisosomes LAMP-1 (veure *Materials i mètodes*). Aquestes associacions no s'han alterat en presència de quinpirole (Fig. 6a). La distribució de la fluorescència ha estat molt diferent en les cèl·lules transfectades només amb la proteïna YFP, que es troba bàsicament al nucli i que no es redistribueix en presència de quinpirole (Fig. 6b). Aquests resultats suggereixen que en la proteïna de fusió D_{2L}-YFP, el receptor D_{2L} és el responsable de la localització específica del senyal fluorescent de D_{2L}-YFP i que, a curt termini, el quinpirole no afecta la colocalització de D_{2L}-YFP amb els marcadors vesiculars assajats.

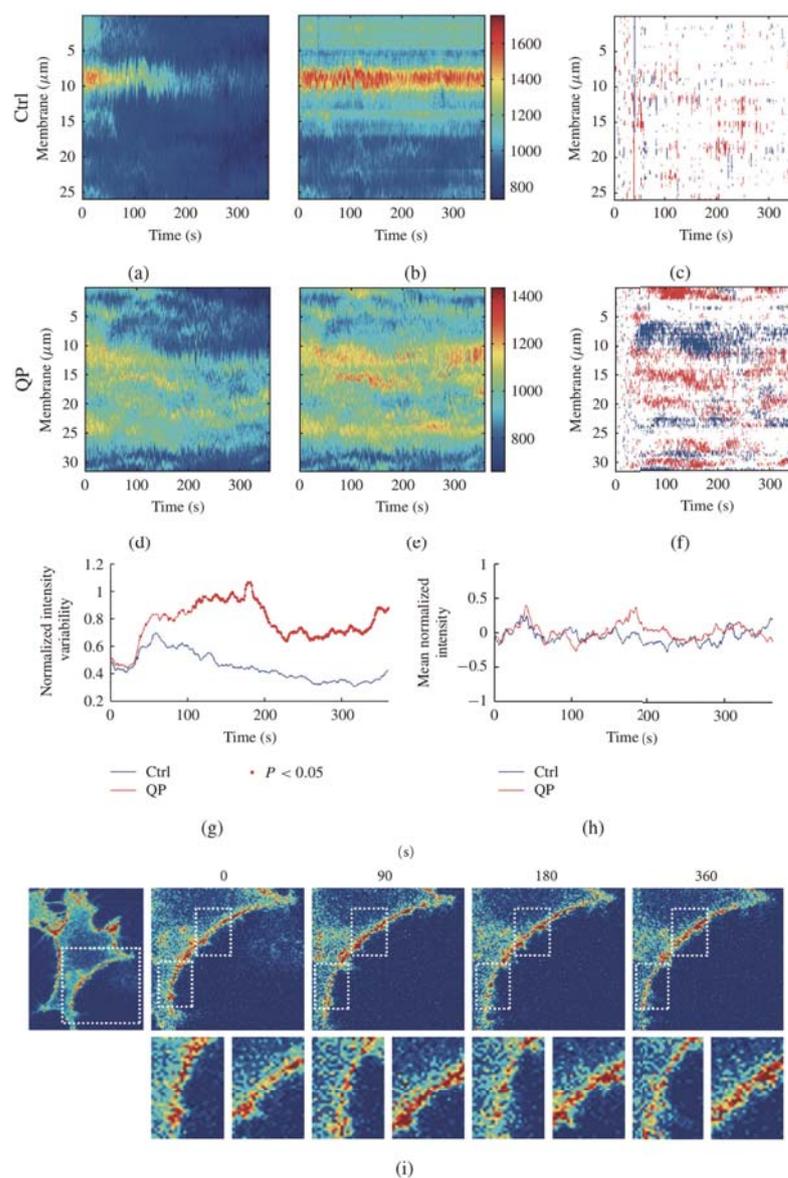


Figura 4. Efecte a curt termini del quinpirole sobre l'expressió de D_{2L}-YFP a la membrana plasmàtica. S'ha estudiat la distribució de D_{2L}-YFP a la membrana plasmàtica de cèl·lules HEK-293 transfectades en un sol pla durant un període de 6 min. S'ha afegit medi o quinpirole (100 nM) 30 s després de començar l'enregistrament. A (a i d) es mostra la intensitat de fluorescència a la membrana plasmàtica en les cèl·lules control i tractades amb quinpirole sense correcció per fotoblanqueig, respectivament. Imatges de les mateixes cèl·lules després de la correcció es mostren a (b i e). A (c i f), representació de la significació estadística ($P < 0.05$) de la intensitat de fluorescència de cada píxel normalitzada respecte les dades obtingudes abans de l'addició de medi o quinpirole. Els increments o decrements significatius es representen en vermell i blau, respectivament. Dades de la intensitat de fluorescència normalitzada per a totes les cèl·lules analitzades (control $n = 22$, quinpirole $n = 24$), només mostra canvis significatius en les cèl·lules tractades amb quinpirole i després de 70 segons de la seva addició (g). Evolució temporal del valor mitjà d'intensitat de fluorescència (h). Un valor d'oscil·lació al voltant de 0 indica que no incrementa ni disminueix l'expressió de D_{2L}-YFP a la membrana plasmàtica. Les imatges magnificades de la membrana plasmàtica amb la correcció per fotoblanqueig a diferents temps mostren regions amb evidents increments o decrements de la intensitat de fluorescència.

1.3 Internalització del receptor D₂.

Un dels processos que es donen després de la unió de l'agonista és el reorganament del receptor al llarg de la superfície cel·lular. Per estudiar els esdeveniments més tardans com la internalització, hem analitzat la intensitat de la fluorescència de D_{2L}-YFP a la superfície cel·lular en experiments més llargs. La intensitat de fluorescència s'ha mesurat al llarg d'una línia de píxels que creua la cèl·lula (Fig. 7a, 7d i 7g) en 360 imatges que s'han adquirit al llarg de 3 h (una imatge cada 30 segons). El fotoblanqueig en aquests experiments a llarg termini i baixa exposició és negligible, per tant s'ha mesurat la màxima intensitat de fluorescència als dos extrems de la cèl·lula i la mínima intensitat de fluorescència (Fig. 7b, 7e i 7h). S'ha representat la relació entre la màxima intensitat de fluorescència a cada costat de la cèl·lula i la mínima (Fig. 7c, 7f i 7i) que proporciona una mesura del grau de fluorescència perdut de la superfície cel·lular. D'aquesta manera, aquest paràmetre pot considerar-se com una mesura en temps real de la internalització. La translocació de D_{2L}-YFP des de la membrana és negligible en les cèl·lules tractades amb vehicle (Fig. 7c i 7j) i resultats similars s'han obtingut després que les cèl·lules hagin estat exposades a quinpirole (Fig. 7f i 7j) indicant que no hi ha hagut una internalització significant de D_{2L}-YFP fins i tot després de tractar-les amb altes concentracions d'aquest agonista. Per comprovar si la falta d'internalització de D_{2L}-YFP en les cèl·lules HEK-293 és específica d'aquest agonista sintètic, també s'han assajat els efectes de l'administració de dopamina. Després de 3 hores d'exposició, no s'han observat diferències significatives en la localització del receptor en cèl·lules tractades amb quinpirole (Fig. 8a) o dopamina (Fig. 8b).

La internalització del receptor D₂ en requereix la fosforilació mitjançant GRK2 o GRK5, i com que les cèl·lules HEK-293 expressen quantitats relativament baixes d'aquestes cinases, la sobreexpressió d'aquestes pot ser necessària per a poder induir una internalització mitjançada per agonista (Ito et al., 1999; Kim et al., 2001). Per tant, s'han cotransfectat les cèl·lules amb D_{2L}-YFP i GRK2 (el cDNA per GRK2 s'ha descrit prèviament a Penela et al., 2001) i s'han enregistrat les imatges cada 30 segons durant 3 hores en presència o en absència de quinpirole. L'anàlisi ANOVA unidireccional ha mostrat diferències significatives en l'índex d'internalització i els tests post-hoc han mostrat que el quinpirole ha provocat una internalització més gran en cèl·lules cotransfectades amb GRK2 i D_{2L}-YFP respecte a la de les cèl·lules

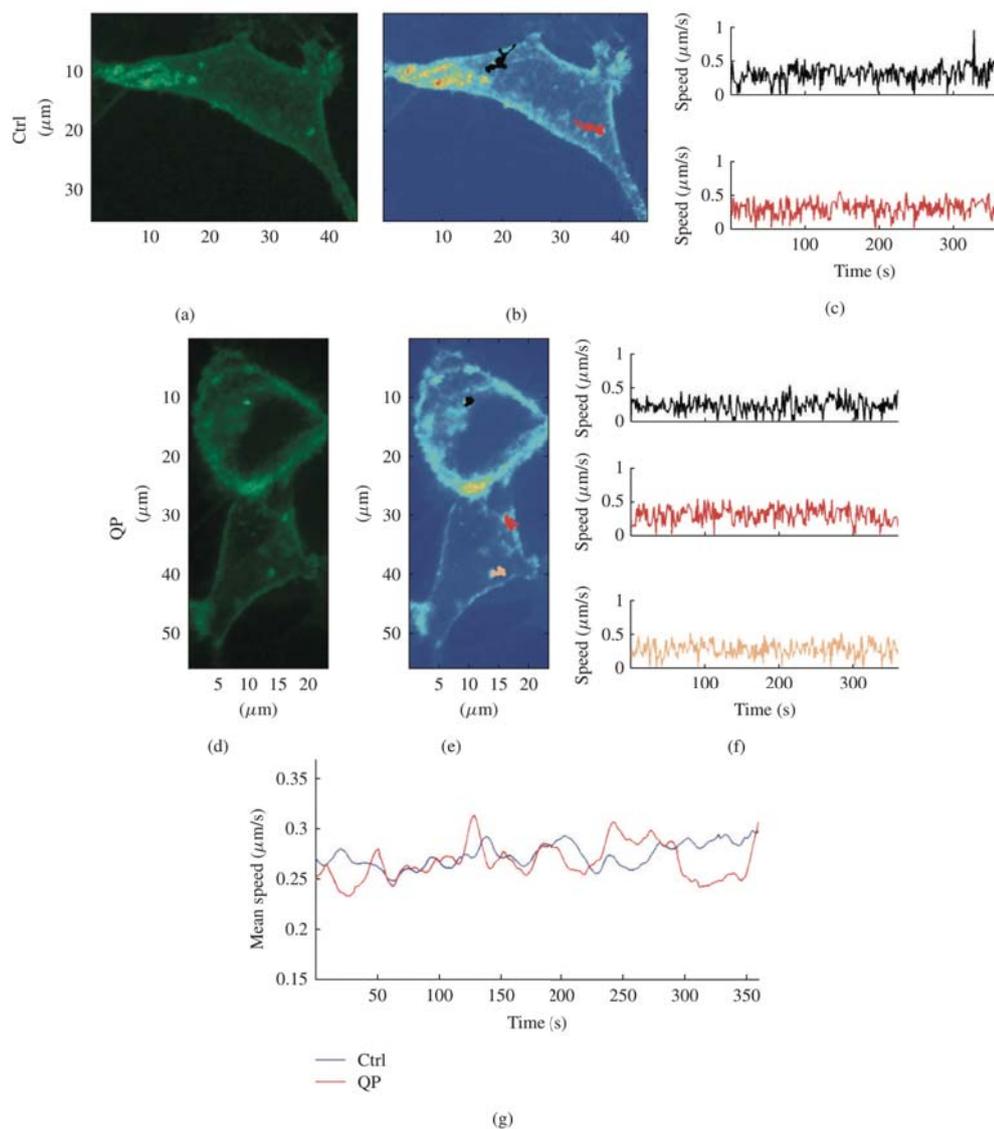


Figura 5. Tràfic vesicular de D_{2L}-YFP. S'han enregistrat les cèl·lules que expressen de D_{2L}-YFP durant 6 min. S'ha afegit medi o quinpirole (100 nM) 30 s després del començament de l'experiment. S'ha utilitzat un apilament que comprèn la part central de la cèl·lula per a l'anàlisi (a i d). La posició de la vesícula s'ha marcat en la primera imatge de l'apilament per seguir-la durant el temps (b i e). La desconvolució espacial ha permès calcular la distància recorreguda per les vesícules en les cèl·lules tractades amb medi o quinpirole i establir-ne la velocitat a cada temps (c i f). L'anàlisi de la distància mitjana recorreguda per totes les vesícules analitzades (medi = 23, quinpirole = 17) indiquen un comportament similar en cèl·lules tractades i no tractades.

transfectades només amb D_{2L}-YFP o en cèl·lules control tractades amb vehicle. De manera interessant, les diferències significatives no s'han observat fins a 97 min després del tractament encara que després s'han mantingut fins al final de l'experiment (180 min). Aquests resultats indiquen que la internalització de D_{2L}-YFP en les cèl·lules HEK-293 requereix la sobreexpressió de GRKs i que ocorre un temps després de l'administració de l'agonista.

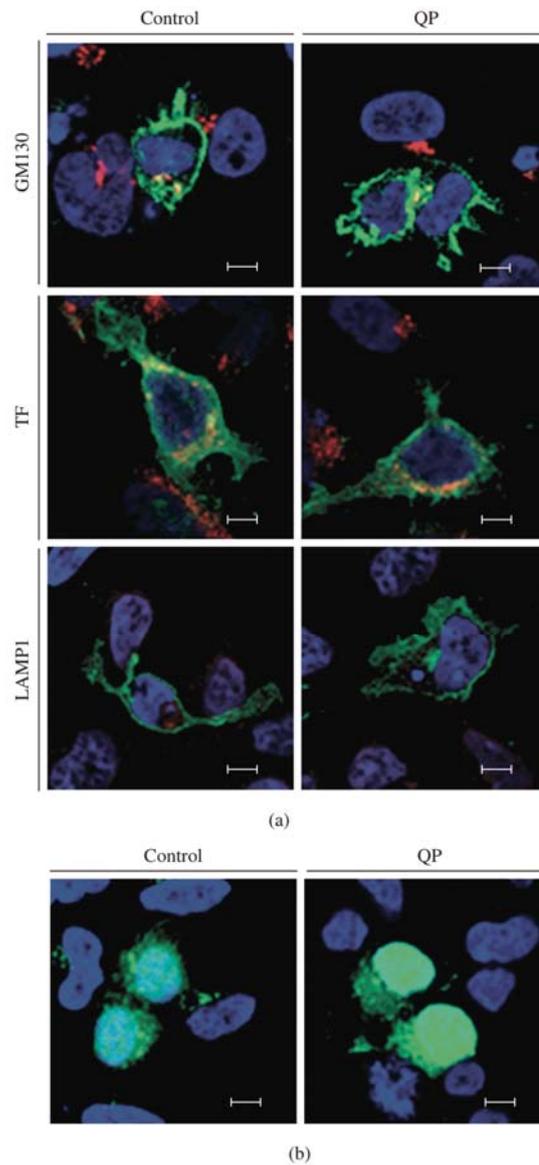


Figura 6. Caracterització de les vesícules que contenen D_{2L}-YFP. Les cèl·lules HEK-293 que expressen D_{2L}-YFP (a) o YFP (b) s'han tractat durant 6 min amb medi o quinpirole (100 nM). A (a) s'ha detectat D_{2L}-YFP mitjançant la seva pròpia fluorescència (verd) i, de dalt a baix, s'ha detectat mitjançant immunocitoquímica (vermell) els marcadors de Golgi (GM130), endosomes (receptor de transferrina) o de lisosomes (LAMP1); els nuclis cel·lulars s'han marcat amb Hoescht (blau). A (b) distribució nuclear de la proteïna YFP (verd) en dues imatges representatives de dues preparacions diferents. Barra d'escala: 10 μm.

1.4 Discussió

L'estudi dels processos dinàmics en cèl·lules vives requereix l'adquisició de dades a alta velocitat i el manteniment d'un ambient cel·lular gairebé constant. La microscòpia confocal de disc giratori permet l'adquisició d'imatges amb una reducció significativa del fotoblanqueig respecte a altres tècniques. La viabilitat

es manté alta durant el transcurs de l'experiment ja que les cèl·lules en observació es conserven a temperatura constant en una cambra humida i amb una atmosfera d'un 5% de CO₂. Utilitzant aquesta tècnica per a l'estudi de la dinàmica del receptor D₂ s'han pogut calcular paràmetres que són útils per a analitzar els processos dinàmics que es donen a la superfície cel·lular.

Com que els microscopis confocals de disc giratori no poden eliminar completament el fotoblanqueig, el primer objectiu d'aquest estudi ha estat caracteritzar-lo i corregir-lo. Havent corregit les imatges per aquest paràmetre ha estat possible calcular la velocitat de moviment lateral d'un GPCR induït per l'activació amb un agonista. L'administració de quinpirole porta a un increment en la fracció mòbil de receptor, un fet que pot ser degut a un increment en la fluïdesa de la bicapa lipídica i/o ser assistit per proteïnes bastida. De totes maneres, la velocitat del moviment lateral (0,08 µm/s) és similar en presència o en absència de quinpirole i es correspon a la distància recorreguda cada segon que és equivalent a 20 cops el diàmetre del receptor D_{2L} (aproximadament 4 nM). En altres estudis s'ha suggerit que els punts calents (*hot spots*), corresponents a acumulacions de receptors de dopamina a la superfície cel·lular, estan relacionats amb la formació de vesícules d'endocitosi en cèl·lules CHO transfectades (Genedani et al., 2005; Torvinen et al., 2005). Els resultats d'aquest estudi indiquen que, en cèl·lules HEK-293, l'acumulació del receptor D₂ en àrees específiques de la membrana plasmàtica no necessàriament desencadena la internalització, és a dir, que aquests *hot spots* apareixen fins i tot en absència d'internalització mitjançada per agonista mesurable.

En teixits nadius i en cèl·lules cotransfectades, el receptor D₂ pot formar heteròmers amb altres receptors com el receptor A_{2A} d'adenosina (Hillion et al., 2002). Aquests heteròmers s'han detectat en cèl·lules vives per tècniques biofísiques, com les de transferència d'energia per ressonància (Navarro et al., 2008; Carriba et al., 2008; Cabello et al., 2009). La microscòpia confocal de disc giratori permet monitoritzar el moviment del receptor D₂ en temps real, tot i que la mida del píxel (0.13 µm) no permet identificar receptors individualment. La intensitat de fluorescència en cada píxel depèn de la quantitat de receptors present en l'àrea que ocupa. Per tant, la velocitat de moviment correspon a la de varies molècules de receptor. El grau d'oligomerització del receptor D₂ detectat per BRET (l'anomenat senyal de BRET) no es veu alterat pel tractament amb agonistes (Canals et al., 2003) i d'aquí que l'increment en la fracció mòbil de quinpirole induïda per quinpirole és, per tant, poc probable que sigui el resultat de la formació d'estructures d'ordre superior.

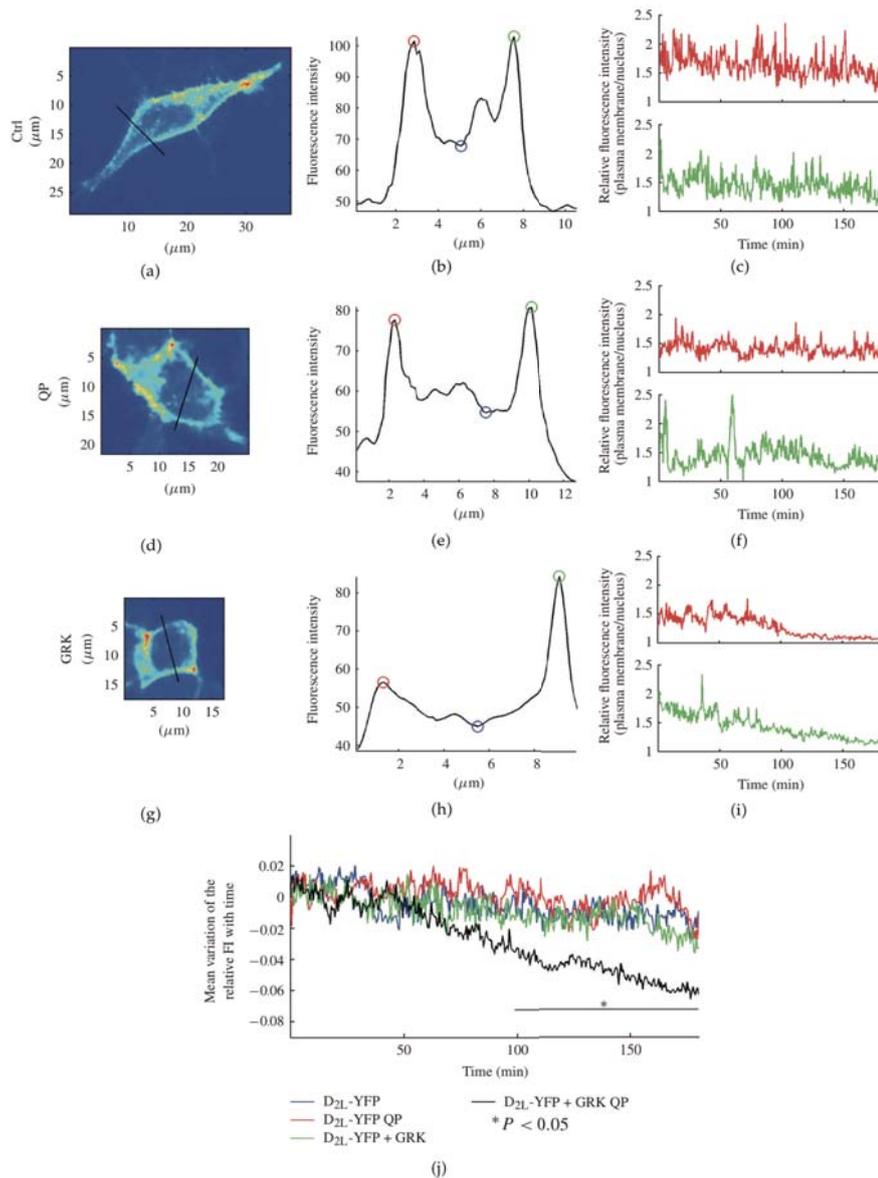


Figura 7. Estudi de la internalització de D_{2L}-YFP. La internalització del receptor s'ha estudiat durant 180 min en cèl·lules HEK-293 que expressen D_{2L}-YFP o D_{2L}-YFP i GRK2, i s'ha usat un apilament que comprèn la part central de les cèl·lules per a l'anàlisi. La intensitat de fluorescència s'ha mesurat al llarg d'una línia que creua la cèl·lula (a, d i g) i s'ha comptat i representat, (b, e i h). Per a cada representació s'ha detectat la mínima intensitat de fluorescència (cercle blau) i les dues intensitats màximes a ambdós costats (cercles verd i vermell). S'ha establert una ràtio entre els dos màxims i el mínim, i l'evolució d'aquest ràtio al llarg del temps s'ha representat per a cada cèl·lula (c, f i i). La ràtio normalitzada per a les cèl·lules analitzades es representa a (j). A 97 min de l'addició de quinpirole s'han detectat diferències significatives, per mitjà d'una anàlisi ANOVA unidireccional, entre les cèl·lules que expressen D_{2L}-YFP i GRK2 tractades amb quinpirole i les no tractades. En absència de coexpressió de GRK2 no hi ha cap diferència detectable entre les cèl·lules tractades i no tractades amb quinpirole.

Agafats en conjunt, aquests resultats indiquen que els complexos de receptors es mouen sense que se n'alteri el grau d'oligomerització. De totes maneres, cal dir que les tècniques de BRET i/o les condicions en les que es duen a terme els assaigs de transferència d'energia poden no ser els adequats per mesurar canvis en el grau d'oligomerització dels GPCR.

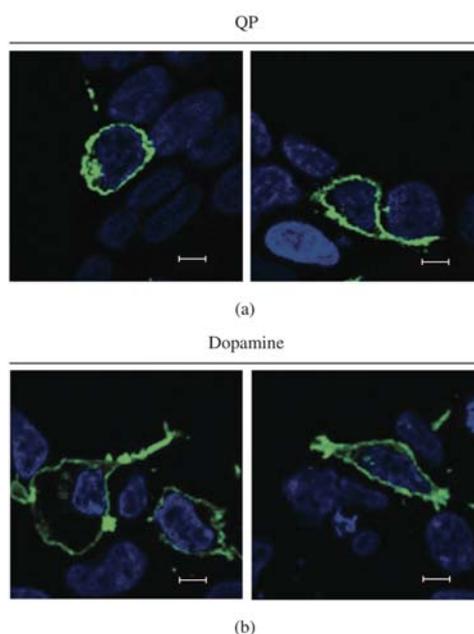


Figura 8. Efecte del tractament amb quinpirole sobre l'expressió de D_{2L} a la membrana plasmàtica. Les cèl·lules HEK-293 que expressen D_{2L}-YFP s'han tractat durant 180 min amb quinpirole (100 nM; a) o dopamina (50 nM; b). El receptor D_{2L}-YFP s'ha detectat per la seva pròpia fluorescència (verd) i els nuclis cel·lulars s'han tenyit amb Hoescht (blau). Per a cada condició es mostren dues imatges representatives de preparacions diferents. Barra d'escala: 10 µm.

Anteriorment s'han proposat hipòtesis controvertides pel que fa a la dessensibilització de sistema inhibitor d'AMPC acoblat a D₂ i la regulació a l'alta o a la baixa dels llocs d'unió del D₂ disponibles a la superfície cel·lular (Bartlett et al., 2005, Ng et al., 1997). De totes maneres, aquestes hipòtesis són contradites per l'exquisida sensibilitat dels agonistes de D₂ que s'ha demostrat en teràpies a llarg termini en humans, com les que es requereixen per combatre els adenomes que secreten prolactina (Ng et al., 1992). Les dades del nostre estudi han demostrat que la isoforma llarga del receptor D₂ mostra poca internalització induïda per l'agonista. I efectivament, la colocalització de les vesícules que contenen D₂ amb marcadors de Golgi i endosoma, però no de lisosomes, també indiquen que se'n preserva l'eficàcia. Aquestes dades són consistents amb les troballes que mostren que la resistència del sistema

inhibidor de l'adenilat ciclasa acoblat a D₂ a la dessensibilització induïda per agonista pot ser deguda a un increment dels receptors a la superfície cel·lular a través de la translocació de receptors intracel·lular existents i provinents de la síntesi *de novo* (Ng et al., 1997). La down-regulació del D₂ pot ser que només s'apliqui a la isoforma curta D_{2S}, els llocs d'unió de la qual desapareixen més ràpidament de la superfície cel·lular que els de la forma D_{2L} (Itokawa et al., 1996) o a diferències en el model cel·lular o l'aproximació tècnica utilitzada. Els nostres resultats suggereixen que la dessensibilització ocorre més ràpid en línies cel·lulars que expressen nivells més alts de GRKs, així, la coexpressió de D_{2L} i GRK en cèl·lules HEK-293 produeix una internalització significant. No es pot descartar la possibilitat que la presència de YFP afecti el grau o la temporalitat de la down-regulació del receptor; d'altra banda, l'assaig d'activació amb agonista en presència d'anticossos anti-D₂ també pot afectar el tràfic de receptors. De totes maneres, la representació d'imatges de cèl·lules HEK-293 expressant el receptor marcat amb emissor de fluorescència és una aproximació convenient i fiable per estudiar el tràfic dels receptors D₂. A més, l'aproximació basada en imatges descrita en aquest estudi pot revelar microdominis a la superfície cel·lular que poden restar amagats utilitzant altres tipus de tècniques.

En resum, el mètode d'anàlisi d'imatges descrit en aquest capítol representa una eina nova i valuosa per a l'avaluació qualitativa i quantitativa del moviment dels GPCR. Per mitjà d'aquesta aproximació, és possible detectar esdeveniments, tals com el moviment lateral del receptor D₂, fins i tot en absència de la inducció per agonista, la lenta desaparició de la membrana plasmàtica del receptor D₂ activat per l'agonista i l'acceleració d'aquesta desaparició quan es coexpressa GRK2.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 1

- [1] Bartlett SE, Enquist J, Hopf FW, Lee JH, Gladher F, Kharazia V, et al. Dopamine responsiveness is regulated by targeted sorting of D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11521-6.
- [2] Cabello N, Gandia J, Bertarelli DC, Watanabe M, Lluís C, Franco R, et al. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem* 2009;109:1497-507.
- [3] Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 2003;278:46741-9.
- [4] Carrià P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casado V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 2008;5:727-33.

- [5] Dobrucki JW, Feret D, Noatynska A. Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies. *Biophys J* 2007;93:1778-86.
- [6] Dumoulin A, Triller A, Kneussel M. Cellular transport and membrane dynamics of the glycine receptor. *Front Mol Neurosci* 2009;2:28.
- [7] El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR. Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci* 2007;18:37-66.
- [8] Genedani S, Guidolin D, Leo G, Filaferro M, Torvinen M, Woods AS, et al. Computer-assisted image analysis of caveolin-1 involvement in the internalization process of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterodimers. *J Mol Neurosci* 2005;26:177-84.
- [9] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091-7.
- [10] Inoue S, Inoue T. Direct-view high-speed confocal scanner: the CSU-10. *Methods Cell Biol* 2002;70:87-127.
- [11] Ito K, Haga T, Lameh J, Sadee W. Sequestration of dopamine D2 receptors depends on coexpression of G-protein-coupled receptor kinases 2 or 5. *Eur J Biochem* 1999;260:112-9.
- [12] Itokawa M, Toru M, Ito K, Tsuga H, Kameyama K, Haga T, et al. Sequestration of the short and long isoforms of dopamine D2 receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 1996;49:560-6.
- [13] Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG. Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *J Biol Chem* 2001;276:37409-14.
- [14] Lewitt PA. Levodopa for the treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2008;359:2468-76.
- [15] Lieberman JA, Bymaster FP, Meltzer HY, Deutch AY, Duncan GE, Marx CE, et al. Antipsychotic drugs: comparison in animal models of efficacy, neurotransmitter regulation, and neuroprotection. *Pharmacol Rev* 2008;60:358-403.
- [16] Maddox PS, Moree B, Canman JC, Salmon ED. Spinning disk confocal microscope system for rapid high-resolution, multimode, fluorescence speckle microscopy and green fluorescent protein imaging in living cells. *Methods Enzymol* 2003;360:597-617.
- [17] Moreno E, Vaz SH, Cai NS, Ferrada C, Quiroz C, Barodia SK, et al. Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. *J Neurosci* 2011;31:7412-23.
- [18] Navarro G, Carriba P, Gandia J, Ciruela F, Casado V, Cortes A, et al. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* 2008;8:1088-97.
- [19] Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, et al. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 2010;285:27346-59.
- [20] Ng GY, George, S.R. Pituitary adenomas. *Contemporary Oncology* 1992;4-10.
- [21] Ng GY, Varghese G, Chung HT, Trogadis J, Seeman P, O'Dowd BF, et al. Resistance of the dopamine D2L receptor to desensitization accompanies the up-regulation of receptors on to the surface of Sf9 cells. *Endocrinology* 1997;138:4199-206.
- [22] Penela P, Elorza A, Sarnago S, Mayor F, Jr. Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *EMBO J* 2001;20:5129-38.
- [23] Torvinen M, Torri C, Tombesi A, Marcellino D, Watson S, Lluís C, et al. Trafficking of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *J Mol Neurosci* 2005;25:191-200.
- [24] Wang E, Babbey CM, Dunn KW. Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems. *J Microsc* 2005;218:148-59.

CAPÍTOL 2

Paràmetres Farmacològics per a Receptors Dimèrics Obtinguts a Partir d'Experiments de Competició. Modulació Agonista-Antagonista.

Un aspecte imprescindible en la caracterització de nous fàrmacs dirigits contra GPCR és conèixer les seves característiques farmacològiques, és a dir, conèixer l'afinitat que mostren per unir-se als receptors tal com s'expressen *in vivo*. Moltes vegades els paràmetres farmacològics es determinen utilitzant membranes de cèl·lules transfectades amb el receptor d'interès o bé membranes de teixits que expressen el receptor, i clàssicament s'han aplicat models d'unió de lligands que consideren els GPCR com unitats monomèriques. La visió clàssica dels receptors com a entitats individuals ha canviat en els darrers anys i avui en dia està plenament acceptat que els GPCR formen homòmers amb una estructura mínima d'homodímers. Aquests dímers actuarien com una unitat funcional i, per tant, s'ha de tenir en compte aquest fet a l'hora d'estudiar les propietats farmacològiques d'aquests receptors. L'aplicació de models dimèrics en l'estudi de les característiques farmacològiques és el que s'ha abordat en aquest capítol d'acord amb l'Objectiu 2 d'aquesta Tesi.

Encara que, des d'un punt de vista teòric, sigui obvi que s'han d'usar els models dimèrics per a ajustar les dades d'unió a un gran nombre de GPCR, els models dimèrics, tal com s'havien descrit originalment (Franco et al., 2005; 2006; Durroux et al., 2005), proporcionen equacions que inclouen constants microscòpiques d'afinitat que no donen informació pràctica de com determinar les els valors de les constants macroscòpiques. El model desenvolupat recentment per Casadó et al. (2007) descriu un anàlisi macroscòpic que és aplicable al maneig de dades farmacològiques en el dia a dia. En aquest estudi s'han seleccionat com a model els receptors D_1 i A_{2A} d'adenosina degut a la seva

capacitat ben caracteritzada de formar dímers (George et al., 1998; O'Dowd et al., 2005; Kong et al., 2006; Canals et al., 2004). Les dades d'unió de lligands dels experiments de competició antagonista/agonista s'han ajustat a les equacions desenvolupades a partir del model monomèric d'unió a dos llocs independents o del *two-state dimer receptor model*. S'han calculat les constants macroscòpiques d'equilibri de la dissociació per a l'agonista, l'índex de cooperativitat del dímer, que reflecteix la comunicació molecular entre els monòmers del dímer per l'agonista, i una constant d'equilibri de dissociació híbrida radiolligand/competidor, que reflecteix la modulació antagonista/agonista en experiments de competició. Tots aquests paràmetres poden ajudar en els criteris per a seleccionar fàrmacs en desenvolupament.

Els resultats d'aquest capítol es troben publicats a **Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation** Casadó V, Ferrada C, Bonaventura J, Gracia E, Mallol J, Canela E.I., Lluís C., Cortés A, i Franco R. *Biochemical Pharmacology* 78 (2009) 1456–1463.

2.1 Comparació de les constants de dissociació macroscòpiques per la unió de l'agonista SKF 81297 al receptor D₁ de dopamina calculades usant el two-state dimer receptor model o el model monomèric per a dos llocs d'unió independents.

S'han realitzat experiments de competició emprant membranes d'estriat de xai (de 0.25 a 0.5 mg de proteïna/ml), tal com s'han d'escrit a la secció de *Materials i Mètodes*, amb l'antagonista del receptor D₁ de dopamina marcat radioactivament [³H]SCH 23390 (NEN PerkinElmer, Wellesley, EUA) a una concentració constant (1.8 nM o 0.8 nM) i concentracions creixents de l'agonista del receptor D₁ SKF 81297 (triplicats de 13 concentracions diferents des de 0.1 nM fins a 50 µM; Tocris, Ellisville, EUA). La unió inespecífica s'ha determinat en presència 10 µM de SCH 23390 (Tocris, Ellisville, EUA). Les dades d'unió (Fig. 1 i 2) s'han ajustat a les equacions derivades del *two-state dimer receptor model*. La unió de [³H]SCH 23390 mostrava representacions de Scatchard no lineals per tant les dades s'han ajustat a les Eq. 2 i 5 (veure secció de *Materials i Mètodes*) introduïnt el valor de 0.47 nM pel paràmetre K_{DA1} calculat en estudis anteriors per a la unió no-cooperativa de [³H]SCH 23390 al receptor D₁ (Casadó et al., 2007).

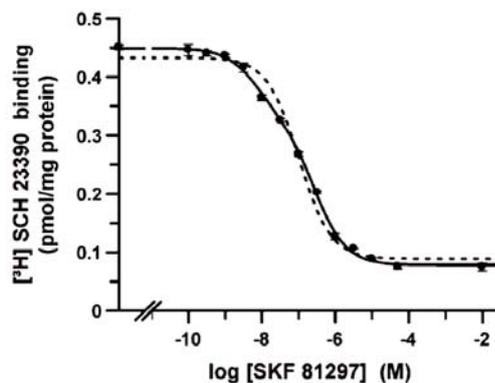


Figura 1. Experiments de competició usant una concentració relativament alta d'antagonista del receptor D_1 i concentracions creixents de l'agonista del receptor D_1 SKF 81297. Els experiments de competició del l'antagonista $[^3\text{H}]\text{SCH 23390}$ (1.8 nM) versus concentracions creixents de l'agonista SKF 81297 (de 0.1 nM a 50 μM) usant membranes d'estriat de xai (0.5 mg de proteïna/ml) s'han realitzat tal com s'ha indicat a *Materials i mètodes*. Les dades s'han ajustat als models monomèrics de dos llocs independents (Eq. 7) o al *two-state dimer receptor model* (Eq. 5; línia sòlida) i al model d'unió a un centre (Eq. 6; línia discontinua). Usant el test F, s'ha obtingut una probabilitat més gran del 95% ($p < 0.05$) en considerar significantment millor els *two-state dimer receptor model* i el de dos llocs d'unió independents per sobre el model d'un sol centre. Les dades s'ajusten bé a l'Eq. 5 i no es millor de manera significant l'ajust quan s'ajusten a l'Eq. 2. Es mostren els valors de la mitjana \pm SEM d'un experiment representatiu realitzat en triplicats.

A una concentració de $[^3\text{H}]\text{SCH 23390}$ de 1.8 nM s'ha obtingut una corba bifàsica (Fig. 1) i l'ajust de les dades a l'Eq. 2 no és millor que l'ajust a l'Eq. 5. De fet, les dades obtingudes per la corba de competició s'ajusten bé al *two-state dimer receptor model* sense cooperativitat per la unió de SKF 81297 (línia sòlida a la Fig. 1) i els valors calculats per als paràmetres R_T , K_{DB1} i K_{DAB} es mostren a la Taula 1. El paràmetre híbrid K_{DAB} , que reflecteix la modulació agonista-antagonista, ens és útil per explicar la corba bifàsica en el cas de la unió no cooperativa (veure la discussió posterior). A efectes comparatius, les dades també s'han ajustat als models monomèrics assumint un o dos llocs d'unió independents. Les corbes bifàsiques no poden ser explicades per models monomèrics que assumeixin un sol lloc d'unió de lligands, per tant, s'han ajustat al model de dos llocs d'unió independents requerint constants d'equilibri significantment diferents (Fig. 1). Ajustant les dades a les Eq. 7 i 8 s'han obtingut les dues constants d'equilibri K_{DH} i K_{DL} (Taula 1); la quantitat de receptor en cada un d'aquests estats: R_H (per a l'alta afinitat) i R_L (per a la baixa), essent de 35:65 la proporció de receptors en estat d'alta afinitat (usualment considerats com a units a proteïna G) versus els que estan en estat de baixa afinitat (usualment considerats com a no units a proteïna G).

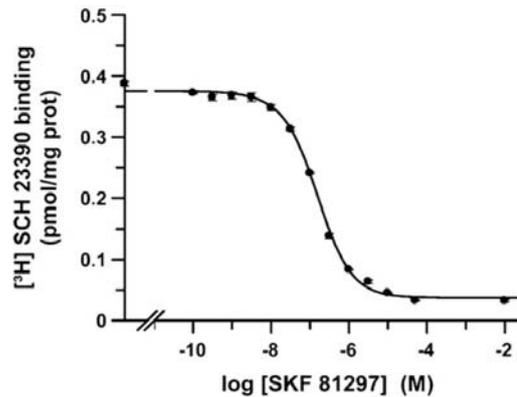


Figura 2. Experiments de competició usant una concentració relativament baixa d'antagonista del receptor D₁ i concentracions creixents de l'agonista del receptor D₁ SKF 81297. Els experiments de competició del l'antagonista [³H] SCH 23390 (0.8 nM) *versus* concentracions creixents de l'agonista SKF 81297 (de 0.1 nM a 50 μM) usant membranes d'estriat de xai (0.5 mg de proteïna/ml) s'han realitzat tal com s'ha indicat a *Materials i mètodes*. Les dades s'han ajustat al *two-state dimer receptor model* (Eq. 5) i al model d'unió a un centre (Eq. 6). Usant el test F, no s'ha obtingut un ajust millor ajustant les dades a models més complexos (Eq. 2 o el model de dos llocs d'unió independents, Eq. 7). Les dades s'ajusten bé a l'Eq. 5 i no es millora de manera significant l'ajust quan s'ajusten a l'Eq. 2. Es mostren els valors de la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu realitzat en triplicats.

A una concentració de [³H]SCH 23390 de 0.8 nM (Fig. 2) s'ha obtingut una corba de competició monofàsica. Les dades s'han ajustat al *two-state dimer receptor model* i també als models monomèrics assumint un (Eq. 6) o dos (Eq. 7) llocs d'unió. Les dades mostrades a la Fig. 2 s'ajusten suficientment bé a un dímer sense cooperativitat i no s'ha trobat una millora en l'ajust quan s'ajusten a una equació més complexa (Eq. 7). És de destacar que els paràmetres deduïts usant el *two-state dimer receptor model* no són significativament diferents dels obtinguts a una concentració més alta de radiolligand, indicant que aquest model dona valors de paràmetres robustament consistents amb independència de la concentració de radiolligand usada. Per tant el fet de considerar que el receptor actua com un dímer pot explicar els resultats obtinguts en la unió de radiolligands. Per contra, els paràmetres calculats assumint monòmers difereixen en ambdues condicions experimentals (Taula 1), fet que no té una explicació mecànica considerant aquest model.

Taula 1. Valors dels paràmetres obtinguts ajustant les dades dels experiments de competició per la unió als receptors D₁ de dopamina de l'antagonista [³H]SCH 23390 amb l'agonista SKF 81297 a diferents models.

Model	Parameters	1.8 nM [³ H]SCH 23390	0.8 nM [³ H]SCH 23390
One-site receptor model	R (pmol/mg protein)		0.54 ± 0.07
	K _D (nM)		56 ± 8
Two-independent-site model	R _H (pmol/mg protein)	0.16 ± 0.02	
	K _{DH} (nM)	1.7 ± 0.4	
	R _L (pmol/mg protein)	0.30 ± 0.04	
	K _{DL} (nM)	62 ± 10	
Two-state dimer receptor model	R _T (pmol/mg protein)	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.03
	K _{DB1} (nM)	7 ± 2	6 ± 1
	K _{DB2} (nM)	28 ± 4	24 ± 5
	K _{DAB} (nM)	3 ± 1	1.5 ± 0.7
	D _{CB}	0	0
	D _{AB}	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.2
	B ₅₀ (nM)	14 ± 2	12 ± 2

Els valors són la mitjana ± SEM de tres experiments. R és la unió específica màxima i K_D és la constant d'equilibri de la dissociació del lligand competidor B (SKF 81297). R_H i R_L són, respectivament, la unió específica màxima corresponent, als llocs d'alta i baixa afinitat, i K_{DH} i K_{DL} són les constants d'equilibri de la dissociació total de aquestes aquests centres. R_T és la quantitat total de receptors dimèrics, K_{DB1} i K_{DB2} són respectivament les constants d'equilibri de la dissociació de la primera i la segona unió de B al dímer. K_{DAB} és la constant híbrida d'equilibri de la dissociació de B a un receptor dimèric semioocupat per A ([³H]SCH 23390). D_{CB} és l'índex de cooperativitat per la unió de B i D_{AB} és l'índex de modulació radiolligand/competidor). B₅₀ és la concentració de B que satura el 50% dels receptors.

2.2 *Nous paràmetres que es poden obtenir de les corbes de competició considerant el two-state dimer receptor model.*

Del *two-state dimer receptor model* s'en poden obtenir nous paràmetres que proporcionen informació útil i rellevant. Un d'aquests paràmetres és l'índex de cooperativitat (D_C). El D_C seria una mesura de la modificació ocorreguda sobre el valor de la constant de dissociació ortostèrica quan un dels protòmers nota la unió d'una molècula del mateix lligand a l'altre protòmer d'un dímer. Per la unió de l'agonista SKF 81297 al receptor D₁ de dopamina el valor obtingut ha estat zero (D_{CB} a la Taula 1). Un valor de 0 indica que no hi ha cap signe de cooperativitat, és a dir, que la unió de SKF 81297 a un protòmer del dímer no modifica l'afinitat de la unió de SKF 91297 a l'altre protòmer del dímer.

Un altre paràmetre farmacològic és la constant de dissociació híbrida (K_{DAB} ; Eqs. 1, 2 i 5, a *Materials i mètodes*). La constant K_{DAB} correspon a la constant de dissociació per al lligand competidor (B) quan el dímer està semi-ocupat pel radiolligand (A). Per tant, el valor de K_{DAB} a la Taula 1 és la constant de dissociació de l'agonista SKF 81297 del receptor dimèric que està semi-ocupat per l'antagonista [3 H]SCH 23390. Quan $K_{DAB} = 2 K_{DB1}$ la unió del radiolligand a un protòmer no modifica la unió del lligand competidor al protòmer buit del dímer. Per contraposició, valors de $K_{DAB} < 2 K_{DB1}$ o de $K_{DAB} > 2 K_{DB1}$ indiquen, respectivament, un efecte positiu o negatiu exercit pel radiolligand en la unió del competidor al protòmer buit. Aquest efecte està exercit per un lligand unit a un lloc ortostèric sobre un lligand diferent a l'altre lloc ortostèric del dímer. Això significa que és possible mesurar si la unió de [3 H]SCH 23390 a un dímer buit modula (negativament o positivament) la unió de l'agonista SKF 81297 a l'altra subunitat del dímer. D'acord amb això s'ha introduït un nou paràmetre: l'índex de modulació radiolligand/competidor (D_{AB}). Tal com es defineix, el seu valor és 0 quan la unió del radiolligand al protòmer no afecta a la unió del competidor a l'altre protòmer. Valors positius o negatius de D_{AB} indiquen que la presència d'un radiolligand incrementa o disminueix, respectivament, l'afinitat del competidor per el protòmer buit del dímer. Per al receptor D_1 , $D_{AB} = 0.6$ (Taula 1) indica una modulació positiva entre la unió de [3 H]SCH 23390 i SKF 81297.

A més, des d'un punt de vista farmacològic, un aspecte interessant del *two-state dimer receptor model* és que permet un càlcul directe de la concentració del lligand competidor testat que satura al 50% els receptors (B_{50}), independentment de la naturalesa bifàsica o monofàsica o de la concentració de radiolligand (Taula 1).

2.3 Paràmetres farmacològics obtinguts per a la unió de l'agonista SKF 38393 al receptor D_1 de dopamina calculats assumint dímers o monòmers.

S'han realitzat experiments de competició, tal com s'han descrit anteriorment, a dues concentracions constants de l'antagonista dels receptors D_1 de dopamina [3 H]SCH 23390 (0.11 i 0.67 nM) i concentracions creixents de l'agonista del receptor D_1 SKF 39393 (triplicats de 13 concentracions diferents des de 0.1 nM fins a 50 μ M; Tocris, Ellisville, EUA). A diferència de l'agonista total SKF 81297, l'agonista SKF 39393 és un agonista parcial. Les corbes obtingudes han estat bifàsiques en ambdós casos (Fig. 3), considerant el *two-state dimer receptor*

model, l'ajust de les dades a la Eq. 2 és millor que l'ajust a l'Eq. 5. En concret, les dades s'ajusten bé al *two-state dimer receptor model* amb cooperativitat per la unió de SKF 38393 (línia sòlida a les Fig. 3A i B) i els paràmetres calculats es mostren a la Taula 2. Les dades també s'han ajustat considerant els models monomèrics a un o dos llocs d'unió. Tal com es mostra a la Fig. 3, les dades s'ajusten bé al model de dos llocs d'unió independents (Eq. 7 i 8) i els paràmetres calculats es mostren a la Taula 2. Els paràmetres deduïts amb el *two-state dimer receptor model* no són significativament diferents usant concentracions altes o baixes de radiolligand, indicant la robustesa del model. Per contra, els paràmetres calculats per a l'estat d'alta afinitat assumint monòmers difereixen en ambdues condicions experimentals (Taula 2), cosa que, de nou, no té cap explicació mecànica considerant aquest model.

Taula 2. Valors dels paràmetres obtinguts ajustant les dades dels experiments de competició per la unió als receptors D₁ de dopamina de l'antagonista [³H]SCH 23390 amb l'agonista SKF 38393 a diferents models.

Model	Parameters	0.67 nM [³ H]SCH 23390	0.11 nM [³ H]SCH 23390
Two-independent-site model	R _H (pmol/mg protein)	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.03
	K _{DH} (nM)	1.4 ± 0.3	4.6 ± 0.9
	R _L (pmol/mg protein)	0.56 ± 0.01	0.54 ± 0.03
	K _{DL} (nM)	540 ± 40	530 ± 90
Two-state dimer receptor model	R _T (pmol/mg protein)	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.03
	K _{DB1} (nM)	2.7 ± 0.7	2.7 ± 0.7
	K _{DB2} (nM)	330 ± 50	430 ± 50
	K _{DAB} (nM)	2.1 ± 0.6	3 ± 1
	D _{CB}	-1.5 ± 0.2	-1.6 ± 0.2
	D _{AB}	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1
	B ₅₀ (nM)	30 ± 6	34 ± 6

Els valors són la mitjana ± SEM de tres experiments. R_H i R_L són, respectivament, la unió específica màxima corresponent, als llocs d'alta i baixa afinitat per al lligand B (SKF 38393), i K_{DH} i K_{DL} són les constants d'equilibri de la dissociació per aquestes aquestes centres. R_T és la quantitat total de receptors dimèrics, K_{DB1} i K_{DB2} són respectivament les constants d'equilibri de la dissociació de la primera i la segona unió de B al dímer. K_{DAB} és la constant híbrida d'equilibri de la dissociació de B a un receptor dimèric semioocupat per A ([³H]SCH 23390). D_{CB} és l'índex de cooperativitat per la unió de B i D_{AB} és l'índex de modulació radiolligand/competidor). B₅₀ és la concentració de B que satura el 50% dels receptors.

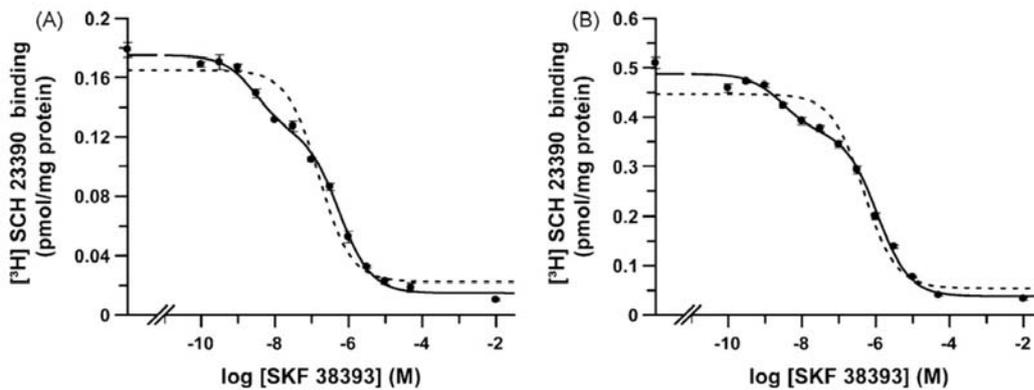


Figura 3. Experiments de competició usant una concentració constant d'antagonista del receptor D₁ i concentracions creixents de l'agonista del receptor D₁ SKF 38393. Els experiments de competició del l'antagonista [³H] SCH 23390 (0.11 nM (A) o 0.67 nM (B)) *versus* concentracions creixents de l'agonista SKF 38393 (de 0.1 nM a 50 μM) usant membranes d'estriat de xai (0.27 mg de proteïna/ml) s'han realitzat tal com s'ha indicat a *Materials i mètodes*. Les dades s'han ajustat al model de dos llocs d'unió independents (Eq. 7) o al *two-state dimer receptor model* (Eq. 2) (línies sòlides) i al model d'unió a un centre (Eq. 6; línies discontinües). Usant el test F, s'ha obtingut una probabilitat més gran del 95% ($p < 0.05$) en considerar significantment millor els *two-state dimer receptor model* i el model de dos llocs d'unió independents per sobre del model d'un sol centre. Es mostren els valors de la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu realitzat en triplicats.

2.4 Paràmetres farmacològics per a la unió de l'agonista CGS 21680 als receptors A_{2A} d'adenosina calculats assumint dímers o monòmers.

Per comparar dos receptors diferents, s'han realitzat també experiments de competició en membranes d'estriat de xai (de 0.25 a 0.5 mg de proteïna/ml) a dues concentracions constants de l'antagonista del receptor A_{2A} d'adenosina marcat radioactivament [³H]ZM-241385 (0.7 o 3.6 nM; American Radiolabelled Chemicals, St. Louis, EUA) *versus* concentracions creixents de l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 (triplicats de 13 concentracions diferents des de 0.1 nM fins a 50 μM; Tocris, Ellisville, USA) en presència d'ADA (veure *Materials i mètodes*). La unió específica s'ha determinat en presència de de ZM 241385 (Tocris, Ellisville, EUA) 10 μM. Les dades (Fig. 4) s'han ajustat a les equacions derivades del *two-state dimer receptor model* tenint en compte que el [³H]ZM-241385 mostra representacions de Scatchard lineals (resultats no mostrats). Per tant, s'han ajustat les dades a les Eq. 2 i 5 introduint el valor obtingut prèviament per K_{DA1} de 0.66 nM. A les dues concentracions de radioligand usades l'ajust de les dades a l'Eq. 2 no és millor que l'ajust a l'Eq. 5 indicant una unió no cooperativa per al CGS 21680 (línia sòlida a Fig. 4A i B). Les dades també s'han ajustat als models monomèrics considerant un o dos centres. Tal com es mostra a la Fig. 4A, a la concentració alta de radioligand l'ajust és millor a 2 centres (monomèrics) que a un. En contrast, tal com es mostra a la Fig. 4B

les dades obtingudes a baixes concentracions de radiolligand s'ajusten bé al model d'un centre i no es troba cap millora en l'ajust a l'equació que descriu la unió a dos llocs independents. Els paràmetres calculats apareixen a la Taula 3. Aquests resultats són, per tant, similars als obtinguts amb els receptors de dopamina.

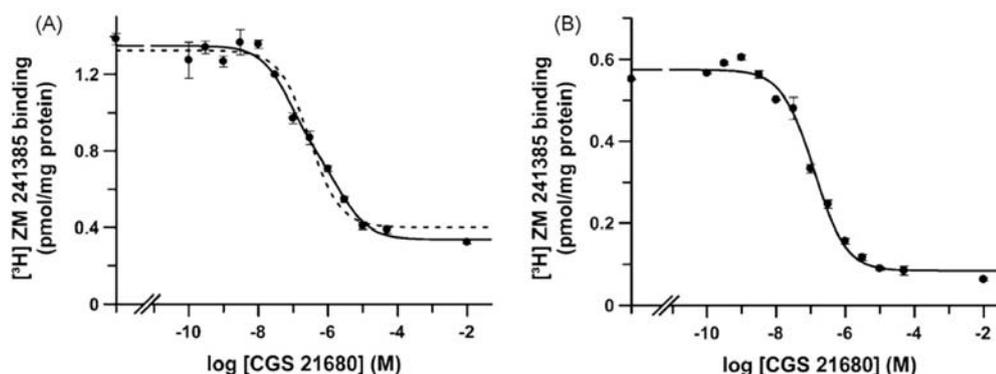


Figura 4. Experiments de competició usant una concentració constant d'antagonista del receptor A_{2A} i concentracions creixents de l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680. Els experiments de competició del l'antagonista [3 H]ZM-241385 (3.6 nM (A) o 0.7 nM (B)) versus concentracions creixents de l'agonista CGS 21680 (de 0.1 nM a 50 μ M) usant membranes d'estriat de xai (0.4 mg de proteïna/ml) s'han realitzat tal com s'ha indicat a *Materials i mètodes*. A 4A, les dades s'han ajustat al model de dos llocs d'unió independents (Eq. 7) o al *two-state dimer receptor model* (Eq. 5) (línies sòlides) i al model d'unió a un centre (Eq. 6; línies discontinües). Usant el test F, s'ha obtingut una probabilitat més gran del 95% ($p < 0.05$) en considerar significantment millor els *two-state dimer receptor model* i el model de dos llocs d'unió independents per sobre del model d'un sol centre. Les dades s'ajusten bé a l'Eq. 5 i no es millora de manera significant l'ajust quan s'ajusten a l'Eq. 2. A 4B, les dades s'han ajustat al *two-state dimer receptor model* (Eq. 5) i al model d'unió a un centre (Eq. 6). Usant el test F, no es millora de manera significativa l'ajust quan s'ajusten les dades a models més complexos (Eq. 2 o 7). Es mostren els valors de la mitjana \pm SEM d'un experiment representatiu realitzat en triplicats.

2.5 Discussió

Un aspecte interessant del *two-state dimer receptor model* és que els valors dels diferents paràmetres poden proporcionar més informació que la que proporcionen els del model de dos llocs d'unió independents. Usant aquest model dimèric, el nombre de receptors dimèrics (R_T), que es correspon amb la meitat de la unió màxima, s'obté directament sense cap assumpció *a priori* sobre l'acoblament o el desacoblament a les proteïnes G o altres. Les dues constants macroscòpiques (K_{DB1} i K_{DB2}) es corresponen a la unió del lligand a un dímer buit o semioocupat, respectivament. La comparació dels valors a les Taules 1-3 mostra que les constants macroscòpiques K_{DB1} i K_{DB2} són diferents de les K_{DH} i K_{DL} obtingudes assumint els models monomèrics clàssics. S'ha de ressaltar que la diferència no és només numèrica sinó també conceptual; els significats de

K_{DB1} i K_{DB2} i els de K_{DH} i K_{DL} són molt diferents i per a un GPCR dimèric és més convenient usar K_{DB1} i K_{DB2} .

Taula 3. Valors dels paràmetres obtinguts ajustant les dades dels experiments de competició per la unió als receptors A_{2A} d'adenosina de l'antagonista [3 H]ZM-241385 amb l'agonista CGS 21680 a diferents models.

Model	Parameters	3.6 nM [3 H]ZM-241385	0.7 nM [3 H]ZM-241385
One-site receptor model	R (pmol/mg protein)		0.9 ± 0.02
	K_D (nM)		56 ± 5
Two-independent-site model	R_H (pmol/mg protein)	0.7 ± 0.1	
	K_{DH} (nM)	11 ± 4	
	R_L (pmol/mg protein)	0.5 ± 0.1	
	K_{DL} (nM)	340 ± 140	
Two-state dimer receptor model	R_T (pmol/mg protein)	0.68 ± 0.02	0.70 ± 0.01
	K_{DB1} (nM)	31 ± 5	24 ± 6
	K_{DB2} (nM)	124 ± 20	96 ± 24
	K_{DAB} (nM)	20 ± 6	27 ± 8
	D_{CB}	0	0
	D_{AB}	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2
	B_{50} (nM)	60 ± 10	50 ± 10

Els valors són la mitjana \pm SEM de tres experiments. R és la unió específica màxima i K_D és la constant d'equilibri de la dissociació del lligand competidor B (CGS 21680). R_H i R_L són, respectivament, la unió específica màxima corresponent, als llocs d'alta i baixa afinitat, i K_{DH} i K_{DL} són les constants d'equilibri de la dissociació per aquests aquests centres. R_T és la quantitat total de receptors dimèrics, K_{DB1} i K_{DB2} són respectivament les constants d'equilibri de la dissociació de la primera i la segona unió de B al dímer. K_{DAB} és la constant híbrida d'equilibri de la dissociació de B a un receptor dimèric semioocupat per A ([3 H]ZM-241385). D_{CB} és l'índex de cooperativitat per la unió de B i D_{AB} és l'índex de modulació radiolligand/competidor). B_{50} és la concentració de B que satura el 50% dels receptors.

Als homodímers de receptors, la unió del primer lligand al lloc ortoestèric pot modificar els paràmetres d'equilibri de la unió de la segona molècula de lligand. En aquest cas, la cooperativitat prové dels canvis conformacionals provocats intramolecularment al dímer de manera homotròpica (és la mateixa molècula la que els produeix). De fet, un dels principals avantatges del *two-state dimer receptor model* és la possibilitat de calcular l'índex de cooperativitat D_C , que és la mesura de les modificacions a la constant de l'equilibri de dissociació que es donen quan un protòmer nota la unió de la mateixa molècula a l'altra protòmer del dímer. Comparant la unió de SKF 81297 i de SKF 38393 als receptors D_1 de dopamina es demostra que l'aparició de cooperativitat homotròpica depèn de les característiques del lligand usat. De fet, l'agonista parcial SKF 38393 mostra una cooperativitat homotròpica negativa (valor negatiu de D_{CB} a la Taula 2) mentre que l'agonista total SKF 81297 té un valor de D_C de 0 (Taula 1) indicant que no hi ha cap signe de cooperativitat. Un aspecte interessant és que les

corbes de competició bifàsiques sovint són interpretades com el resultat d'una cooperativitat negativa en els models dimèrics, i per tant semblaria paradòxic obtenir una corba bifàsica a partir d'una unió no-cooperativa al receptor dimèric (veure Fig. 1 i Taula 1). Això però, és efectivament possible degut al fet que la unió d'un lligand ortostèric pot afectar a la unió d'un altre lligand ortostèric diferent. La constant d'equilibri de dissociació híbrida (K_{DAB}) és la mesura d'aquesta modulació lligand-lligand, i de fet, la constant K_{DAB} correspon a la constant de l'equilibri de dissociació del lligand B quan el dímer està semioocupat pel radiolligand A. Això significa la possibilitat de mesurar l'índex de modulació radiolligand/competidor (D_{AB}). Quan ocorre aquest tipus de modulació la forma de la corba depèn no només de la cooperativitat homotròpica del competidor (D_{CB}) sinó de la modulació radiolligand/competidor (D_{AB}). Aquest nou concepte de modulació entre dos lligands ortostèrics ha esdevingut molt útil en analitzar els experiments de competició. La constant D_{AB} indicada a la Taula 1 descriu una modulació positiva entre [3 H]SCH 23390 i SKF 81297 que indueix l'aparició d'una corba bifàsica, fins i tot en absència de cooperativitat homotròpica. Aquest fenomen s'il·lustra més exhaustivament a la simulació de la Fig. 5. Assumint que hi hagi una modulació positiva marcada entre el radiolligand i el lligand competidor, el *two-state dimer receptor model* prediu l'evolució de corbes de competició bifàsiques cap a monofàsiques a mesura que disminueix la concentració de radiolligand (Fig. 5). Això s'ha comprovat amb experiments de competició a concentracions de radiolligand suficientment baixes per disminuir aquest efecte d'acord amb la predicció mostrada. Per a baixes concentracions de radiolligand, els paràmetres deduïts segons el *two-state receptor dimer model* per a la unió de SKF 81297 al receptor D_1 (Taula 1) no són significativament diferents dels obtinguts a concentracions més altes de radiolligand, indicant que els valors que s'obtenen per aquest model són robustament consistents amb independència de la concentració de radiolligand usada. Per contra, els paràmetres obtinguts segons els models basats en monòmers no són capaços d'explicar els resultats experimentals. Una altra característica que es posa de manifest quan es comparen els paràmetres farmacològics obtinguts segons el *two-state dimer receptor model* per a les dues concentracions de radiolligands usades (Taula 1, Figs. 1 i 2) és que la modulació antagonista/agonista indueix, a altes concentracions d'antagonista, l'aparició d'una corba de concentració bifàsica independentment de l'existència o no de cooperativitat homotròpica per al competidor, tal i com es prediu pel *two-state dimer receptor model*.

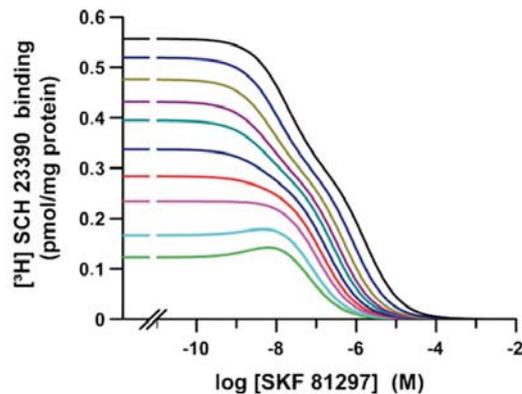


Figura 5. Simulació de corbes de competició. La simulació s'ha realitzat considerant l'Eq. 2 i els valor següents per a cada paràmetre: $R_T = 0.3$ pmol /mg proteïna, $K_{DA1} = 0.47$ nM, $K_{DB1} = 6.5$ nM, $K_{DB2} = 26$ nM, $K_{DAB} = 2.5$ nM, i usant diferents concentracions de radiolligand (A a l'Eq. 2; 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5 i 10 nM de baixa cap a dalt) i concentracions creixents d'agonista (B a l'Eq. 2; de 0.001 nM a 1 mM).

Per estendre aquesta conclusió més enllà dels receptors de dopamina, s'han realitzat experiments de competició per la unió als receptors A_{2A} d'adenosina a dues concentracions de radiolligands diferents (Fig 4). Els paràmetres deduïts pel *two-state dimer receptor model*, i no els basats en models monomèrics (Taula 3), són similars a concentracions altes i baixes de radiolligands, indicant que el *two-state dimer receptor model* dona resultats consistents. Per a l'agonista, CGS 21680, unint-se als receptors A_{2A} d'adenosina el valor de D_{CB} és zero (Taula 3) indicant que no hi ha cooperativitat, i.e. la unió de CGS 21680 a un protòmer no modifica l'afinitat pel CGS 21680 de l'altre protòmer del dímer. Aquest és un exemple en què una unió no-cooperativa pot resultar en una corba bifàsica i, un altre cop, això és degut a que la unió d'un lligand ortostèric pot afectar a un altre lligand ortostèric diferent, un fet que pot ser quantificat en forma de la constant d'equilibri de dissociació híbrida (K_{DAB}). S'ha calculat un índex de modulació radiolligand/competidor (D_{AB}) d'aproximadament 0.4, indicant una modulació positiva entre el $[^3H]ZM-241385$ i el CGS 21680 en la unió als receptors A_{2A} , que indueix l'aparició d'una corba de competició bifàsica en absència de cooperativitat homotròpica. Col·lectivament, aquests resultats indiquen que el *two-state dimer receptor model* és un model adequat per al tractament de les dades d'unió als GPCR.

El model monomèric que considera dos llocs d'unió independents assumeix que els dos estats són independents i que no es modifiquen pels lligands, per tant els canvis significatius en la proporció entre llocs d'alta i baixa afinitat depenent de

la concentració de radiolligand (veure Taules 1-3) no poden explicar-se per aquest tipus de model. A concentracions baixes de radiolligand, la proporció de receptors en alta afinitat (sovint considerada com acoblats a proteïna G) versus els que estan en baixa afinitat (desacoblats de la proteïna G) és de 0:100 per a l'SFK 81297 o de 37:63 per a l'SKF 38393 unint-se al receptor D_1 de dopamina. En canvi, les proporcions són de 35:65 i 26:74, respectivament, quan la concentració de radiolligand és més alta. Per a la unió del CGS 21680 al receptor A_{2A} d'adenosina a baixa concentració de radiolligand, aquesta proporció és de 0:100 mentre que a una concentració més alta de radiolligand és de 58:42. Totes aquestes dades són inconsistents, indicant la impossibilitat dels models monomèrics d'explicar aquestes dades experimentals. Usant el *two-state dimer receptor model* el nombre de receptors dimèrics (R_T) que es correspon amb la meitat de la unió màxima, s'obté directament sense cap suposició *a priori* sobre l'acoblament o desacoblament a les proteïnes G.

El model monomèric de dos llocs d'unió independents s'usa sovint per ajustar dades farmacològiques resultants d'experiments de competició dels quals se'n calculen les constants d'alta (K_{DH}) i de baixa (K_{DL}) afinitat. Tal com s'ha descrit en aquest estudi, el significat, i en alguns casos fins i tot l'existència, d'aquests dos llocs d'unió aparentment depèn de la concentració de radiolligand. A més, pot passar que a concentracions relativament altes d'antagonista radioactiu, el percentatge de receptors amb alta afinitat per l'agonista sigui diferent que l'obtingut a concentracions relativament més baixes (Taules 1-3). Si el model monomèric assumeix que els estats són independents i no modificables per lligand, aquests canvis en la proporció d'alta i baixa afinitat no es poden explicar. A més, cap dels models monomèrics és capaç d'explicar els resultats descrits anteriorment. En resum, s'ha de ser cautelós a l'hora d'usa els models clàssics (monomèrics) a l'hora d'interpretar corbes de competició bifàsiques. En contrast, el *two-state dimer receptor model* prediu la "desaparició d'un estat d'afinitat" a concentracions baixes de radiolligand (Taules 1-3) com a conseqüència de la modulació radiolligand/competidor. I aquest, en efecte, constitueix un dels missatges més interessants d'aquest estudi: la traducció directa d'una corba de competició bifàsica en l'existència de dos estats d'afinitat o en l'existència de cooperativitat homotròpica pot no ser correcta.

A les dues concentracions d'antagonista radioactiu assajades, els paràmetres macroscòpics, i.e. les constants d'equilibri, obtingudes usant el *two-state dimer receptor model* són similars i són independents de la naturalesa monofàsica o bifàsica de la corba de competició. Això pot ser considerat una prova de la

utilitat del model assumint que la concentració de radiolligand mai hauria de modificar el valor dels paràmetres. A més, un altre aspecte interessant, des d'un punt de vista farmacològic, és poder calcular directament la concentració de competidor que satura el 50% dels llocs d'unió (B_{50}). Tal com s'ha demostrat en aquest estudi, el paràmetre B_{50} és més adequat que la IC_{50} que s'usa sovint per ordenar als lligands segons la seva potència d'unió. Per als receptors D_1 de dopamina i A_{2A} d'adenosina, el valor calculat per B_{50} usant l'Eq. 4 i mostrat a les Taules 1-3 es correspon a la concentració d'agonista que satura els receptors al 50%, independentment de la naturalesa de la corba de competició o de la concentració de radiolligand. En contrast, els valor de IC_{50} depenen de la concentració de radiolligand i de la forma de la corba (Fig. 3). Per tant, és evident que IC_{50} no és un paràmetre útil per utilitzar en casos en què les dades d'unió siguin complexes.

Tenint en consideració totes aquestes dades, el *two-state dimer receptor model* dóna informació de la unió màxima ($2R_T$), de les constants de dissociació macroscòpiques i a més, informació rellevant i quantitativa sobre l'existència de la cooperativitat homotròpica (D_C), la modulació radiolligand/competidor (D_{AB}) i un valor (B_{50}) fiable per ordenar els compostos segons la seva potència d'unió. En els casos en què existeix cooperativitat homotròpica o interacció radiolligand/competidor el *two-state dimer receptor model* és el model adequat per a calcular les constants de dissociació macroscòpiques. Tot això és de particular importància per als farmacòlegs per superar els inconvenients derivats de l'ús dels models monomèrics clàssics per ajustar les dades dels experiments d'unió.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 2

- [1] Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 2003;55:509-50.
- [2] Agnati LF, Fuxe K, Ferre S. How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity. *Trends Biochem Sci* 2005;30:188-93.
- [3] Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:274-86.
- [4] Canals M, Burgueno J, Marcellino D, Cabello N, Canela EI, Mallol J, et al. Homodimerization of adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* 2004;88:726-34.
- [5] Casado V, Canti C, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Solubilization of A_1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J Neurosci Res* 1990;26:461-73.

- [6] Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, et al. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 2007;116:343-54.
- [7] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099-108.
- [8] Devi LA. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:532-7.
- [9] Durroux T. Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:376-84.
- [10] Franco R, Canals M, Marcellino D, Ferre S, Agnati L, Mallol J, et al. Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem Sci* 2003;28:238-43.
- [11] Franco R, Casado V, Ciruela F, Mallol J, Lluís C, Canela EI. The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A₁ adenosine receptors. *Biochemistry* 1996;35:3007-15.
- [12] Franco R, Casado V, Cortes A, Mallol J, Ciruela F, Ferre S, et al. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S90-8.
- [13] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, et al. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 2006;69:1905-12.
- [14] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, et al. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem Sci* 2005;30:360-6.
- [15] George SR, Lee SP, Varghese G, Zeman PR, Seeman P, Ng GY, et al. A transmembrane domain-derived peptide inhibits D₁ dopamine receptor function without affecting receptor oligomerization. *J Biol Chem* 1998;273:30244-8.
- [16] George SR, O'Dowd BF, Lee SP. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:808-20.
- [17] Kong MM, Fan T, Varghese G, O'Dowd B F, George SR. Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D₁ dopamine receptor homo-oligomer. *Mol Pharmacol* 2006;70:78-89.
- [18] Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, Rives ML, Bourrier E, Ayoub MA, et al. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 2008;5:561-7.
- [19] Milligan G. G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery. *Drug Discov Today* 2006;11:541-9.
- [20] O'Dowd BF, Ji X, Alijaniam M, Rajaram RD, Kong MM, Rashid A, et al. Dopamine receptor oligomerization visualized in living cells. *J Biol Chem* 2005;280:37225-35.
- [21] Prinster SC, Hague C, Hall RA. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 2005;57:289-98.
- [22] Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 2001;92:71-87.
- [23] Sarrio S, Casado V, Escriche M, Ciruela F, Mallol J, Canela EI, et al. The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A₁ adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane. *Mol Cell Biol* 2000;20:5164-74.
- [24] Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004;5:30-4.
- [25] Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7682-7.

CAPÍTOL 3

El Descobriment d'un Nou Agonista amb Selectivitat i Afinitat per als Receptors D₂ de Dopamina.

Tal com s'ha comentat anteriorment els GPCR representen un alt percentatge del mercat d'agents terapèutics i segueixen essent un focus de la recerca biomèdica i els programes de descoberta de noves drogues. La dopamina està involucrada en diverses funcions biològiques (Gerfen et al., 2004) i per tant els seus receptors han esdevingut dianes en la patofisiologia, entre d'altres, de la malaltia de Parkinson o de l'esquizofrènia (Andersen i Nielsen, 1991; Wu et al., 2005). En aquestes patologies no es veu alterat un sol receptor sinó diversos receptors, de la mateixa família o no, per tant, una de les estratègies proposades és l'ús de lligands multivalents que puguin unir-se a diferents receptors. El nostre grup, en col·laboració amb la Unitat de Química Combinatòria del Parc Científic de Barcelona ha publicat prèviament estudis en què una "estructura privilegiada" pot servir de base per a la derivatització de molècules biològicament actives, amb capacitat per unir-se a diferents receptors (Vendrell et al 2007, 2009; Soriano et al., 2010). Concretament, utilitzant la molècula d'indoloquinolizidina com a estructura privilegiada s'han obtingut lligands que presenten una afinitat moderadament bona per als receptors D₁ i D₂ de dopamina (Vendrell et al., 2009; Soriano et al., 2010). En aquest capítol es presenta l'estudi d'una nova quimioteca desenvolupada a partir de dos diastereoisòmers de la indolo[2,3-a]quinolizidina (Fig. 1a) units a un tripèptid mitjançant, o no, un espaiador que permeti la interacció i encaix dels tripèptids a les zones extracel·lulars del receptor, proporcionant afinitat i selectivitat per al receptor.

Els resultats d'aquest capítol conformen l'Objectiu 3 d'aquesta Tesi i formen part del manuscrit titulat **A Combinatorial Approach towards the Discovery of Indoloquinolizidine-Peptides with Subtype-Selectivity for Dopamine D₂**

Receptors per Molero A., Vendrell M., Bonaventura J., Lluís C., Cortés A., Casadó V. i Royo M. que està en fase d'escriptura per a la seva publicació a la revista *Chem Med Chem*.

3.1 Disseny de la quimioteca de derivats de indolo[2,3-a]quinolizidina unida a diversos tripèptids.

Amb l'objectiu d'evaluar el potencial de diferents derivats de la indoloquinolizidina i la seva aplicació en el desenvolupament de lligands de dopamina, s'ha dissenyat una quimioteca d'híbrids indoloquinolizidina-pèptid dels quals es mostra l'estructura general a la Fig. 1a. Els àcids **1** i **2** (Fig. 1b) presenten diferent estereoquímica relativa als C3 i C12b (*cis* i *trans*, respectivament), que permet diferents configuracions de la indolo[2,3-a]quinolizidina que poden afectar a les propietats biològiques dels híbrids. D'altra banda, l'ús d'una mescla racèmica per ambdós àcids carboxílics es justifica perquè aquest estudi està en el marc d'una fase preliminar de l'evaluació de les propietats d'aquesta estructura com a lligand per a diferents GPCR. Aquesta nova quimioteca s'ha dissenyat tenint en compte els resultats anteriors que indicaven una contribució important del tripèptid en l'afinitat i la selectivitat dels compostos híbrids (Vendrell et al., 2009). La importància d'aquesta part de la molècula és deguda a la interacció dels aminoàcids amb els residus propers al centre ortoestèric, fent que l'heterocicle s'ajusti millor o pitjor al centre ortostèric del receptor (Vendrell et al., 2007). En quimiotèques anteriors, sempre hi havia un aminoàcid cíclic situat a la posició C-terminal (AA₃, Fig. 1), però no s'havien observat diferències entre els diferents aminoàcids utilitzats (Vendrell et al., 2007); per tant, s'ha decidit mantenir un aminoàcid cíclic en aquesta posició. La importància dels residus carregats negativament a la part extracel·lular dels GPCR ha estat àmpliament estudiada (Kim et al., 1995, 1996; Shi i Javitch, 2004), per tant, s'ha decidit emprar un aminoàcid carregat positivament que pugui interaccionar amb aquestes càrregues negatives. Conseqüentment, en aquesta posició s'hi ha incorporat els aminoàcids prolina (Pro), aminoprolina (Amp) o Lisina, per avaluar l'efecte de la càrrega positiva. En la segona posició (AA₂, Fig 1), resultats previs indicaven que funcionaven millor aminoàcids aromàtics i els millors resultats s'obtingueren amb aminoàcids aromàtics substituïts amb fluorurs. Tenint aquest aspecte en condideració, s'ha decidit utilitzar per aquesta posició la 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)) i la 3,4-difluorofenilalanina (Phe(3,4-F₂)). També

s'ha provat l'aminoàcid aromàtic no polar i donador de ponts d'hidrogen triptòfan (Trp) i l'aminoàcid aromàtic polar i donador i acceptor de ponts d'hidrogen tirosina (Tyr) per evaluar la influència que puguin tenir els ponts d'hidrogen en l'afinitat dels compostos. No s'havien observat diferències significatives pel que fa a la naturalesa de l'aminoàcid unit directament a l'estructura de l'alcaloide (AA₁, Figura 1) i per tant s'ha decidit utilitzar una àmplia varietat d'aminoàcids en aquesta posició com l'aminoàcid cíclic prolina (Pro), l'hidrofòbic norleucina (Nle) o els carregats positivament lisina (Lys) o negativament glutamat (Glu), que permeten l'estudi de l'efecte de càrregues properes al l'anell d'indoloquinolizidina i per tant al lloc d'unió. Finalment, per estudiar si la interacció amb els tripèptid era més favorable si aquest estava situat proper o més allunyat del lloc d'unió, s'ha introduït un espaiador entre el tripèptid i l'heterocicle. S'ha escollit l'àcid aminohexanoic (Ahx) com a espaiador perquè no restringeix la conformació de la molècula i proporciona una distància suficient al tripèptid per a interaccionar amb diferents àrees dels receptors. Per tal de limitar els components de la quimioteca s'ha restringit les combinacions d'aminoàcids a 20 tripèptids. Tots els tripèptids només podien contenir un sol aminoàcid carregat i els aminoàcids similars no estaven repetits en la mateixa seqüència.

La síntesi dels compostos l'ha realitzat el grup de la Dra. Míriam Royo, del Parc Científic de la Universitat de Barcelona utilitzant un sistema de síntesi en fase sòlida. S'han obtingut un total de 80 compostos de la combinació de les dues formes de la indolo[2,3-*a*]quinolizidina i els 20 tripèptids amb espaiador o no. Les estructures dels compostos sintetitzats i l'esquema de la seva síntesi es mostren als Apèndix d'aquesta Tesi.

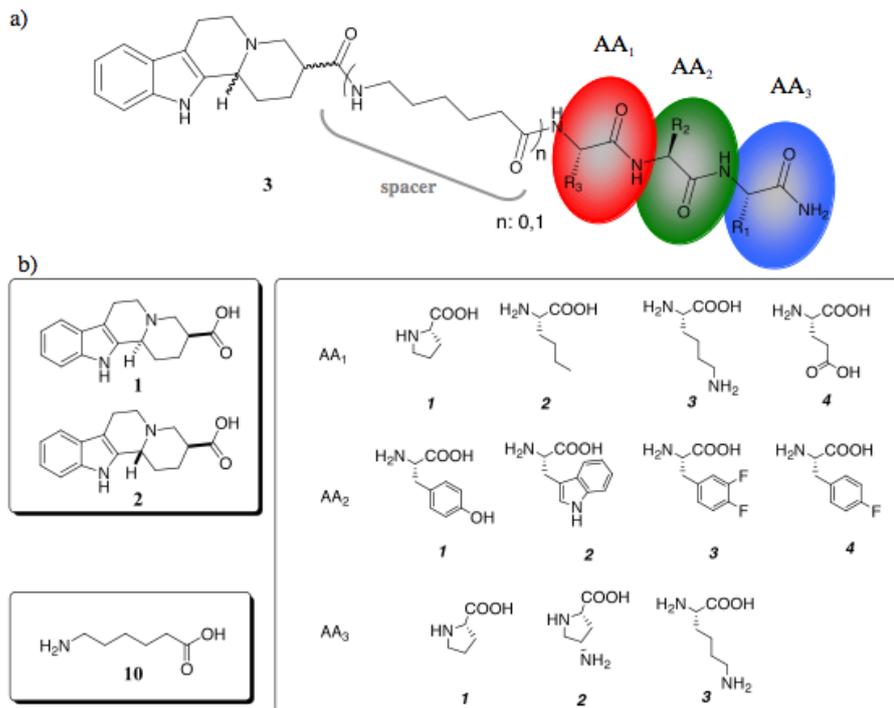


Figura 1. Estructura dels compostos de la quimioteca d'híbrids indoloquinolizidina-pèptid. A (a) es mostra l'estructura general del compost (3). A (b) es mostren els components del compost: la mescla racèmica de indolo[2,3-a]quinolizidina (1 i 2), l'espaiador alifàtic (10) i els diferents aminoàcids que poden estar a les posicions del tripèptid (AA₁, AA₂ i AA₃).

3.2 Avaluació de la quimioteca indolo[2,3-a]quinolizidina-tripèptid per la seva afinitat per als receptors de dopamina.

S'han analitzat les propietats d'unió dels 80 membres de la quimioteca mitjançant assajos puntuals de competició (veure *Materials i mètodes*) emprant membranes estriatals que expressen receptors D₁ i D₂ de dopamina (Gerfen, 2004). Les membranes d'estriat de xai (0,5 mg de proteïna / ml), s'han incubat amb l'antagonista selectiu dels receptors D₁ marcat radioactivament [³H]SCH 23390 (2 nM) o amb l'antagonista selectiu dels receptors D₂ [³H]YM-09151-02 (2 nM) en absència o presència de cadascun dels compostos de la llibreria a una concentració de 50 μM. La unió inespecífica s'ha determinat en presència de 50 μM de SCH 23390 o de 50 μM de l'antagonista del receptor D₂ raclopride, respectivament (Fig. 2). La unió de radiolligand s'ha desplaçat també amb una concentració equivalent a la constant d'afinitat de l'agonista del receptor D₁ SKF 81297 o de l'agonista del receptor D₂ quinpirole per tal de comprovar que, en aquestes condicions, s'obté un desplaçament d'aproximadament el 50% que indica que l'afinitat dels receptors en les preparacions és l'esperada. En vista

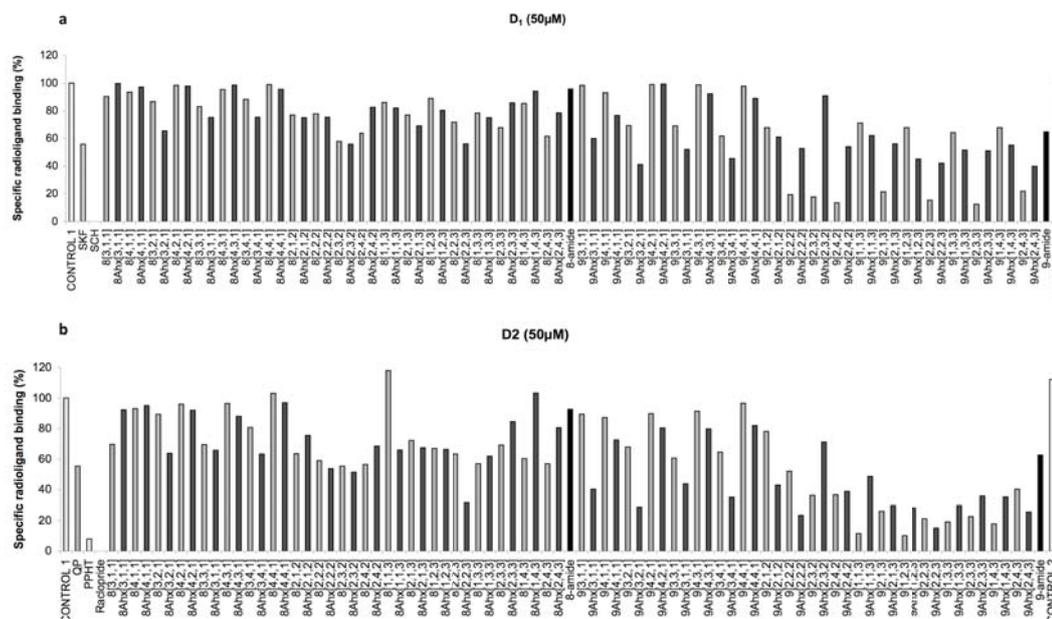


Figura 2. Escombratge dels components de la quimioteca. A (a) es mostra la unió específica de l'antagonista del receptor D₁ [³H]SCH 23390 (2 nM) a membranes d'estriat de xai en presència o no de l'agonista SKF 81297 (30 nM), de l'antagonista SCH 23390 (50 μM) o de cadascun dels 80 compostos de la quimioteca a una concentració de 50 μM. A (b) es mostra la unió específica de l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (2 nM) en presència o no de l'agonista quinpirole (10 nM), de l'agonista PPHT (30 nM), de l'antagonista raclopride (50 μM) o de cadascun dels 80 compostos de la quimioteca a una concentració de 50 μM. En gris es mostren els compostos que tenen espaiador.

que alguns lligands eren capaços de desplaçar més del 50% de la unió específica a una concentració 50 μM, s'ha realitzat un escombratge posterior d'aquells lligands que presentaven millor activitat a una concentració de 5 μM (Fig. 3). Els resultats d'aquests escombratges (Fig. 2 i 3) indiquen una menor afinitat per a ambdós receptors dels compostos en els quals a la part peptídica hi ha glutamat, aminoàcid carregat negativament (**9{4,1-4,1}**, **9Ahx{4,2-4,1}**, **9{4,4,1}**, **8{4,1-4,1}**, **8Ahx{4,1-4,1}**). En canvi, l'afinitat dels compostos en què hi ha un aminoàcid carregat positivament (lisina o aminoproline) a la posició C-terminal de la part peptídica és més bona. Aquests resultats, semblen indicar que les càrregues positives en aquesta posició podrien interaccionar amb la càrregues negatives dels bucles extracel·lulars dels receptors. També s'ha vist una forta influència de l'estereoquímica de l'indoloquinolizidina en la interacció amb els receptors D₂ de dopamina: mentre que els derivats *cis* (**8{1-4,1-4,1-3}**, **8Ahx{1-4,1-4,1-3}**) mostraven afinitats baixes o moderades (Fig. 2b), els derivats *trans* **9{1-4,1-4,1-3}**, **9Ahx{1-4,1-4,1-3}** mostraven una major afinitat per al receptor D₂. La incorporació de l'espaiador alifàtic lineal (aminohexanoic) no afecta significativament a l'afinitat dels compostos. En alguns compostos (i.e. **9{2,4,3}**, **9Ahx{2,4,3}**) la presència de l'espaiador ha millorat l'afinitat per als receptors D₂, en altres (i.e. **9{1,2,3}**, **9Ahx{1,2,3}**) l'afinitat no s'ha vist afectada, i en altres

(i.e. $9\{2,3,3\}$, $9Ahx\{2,3,3\}$) s'ha observat un lleuger efecte negatiu en la seva afinitat.

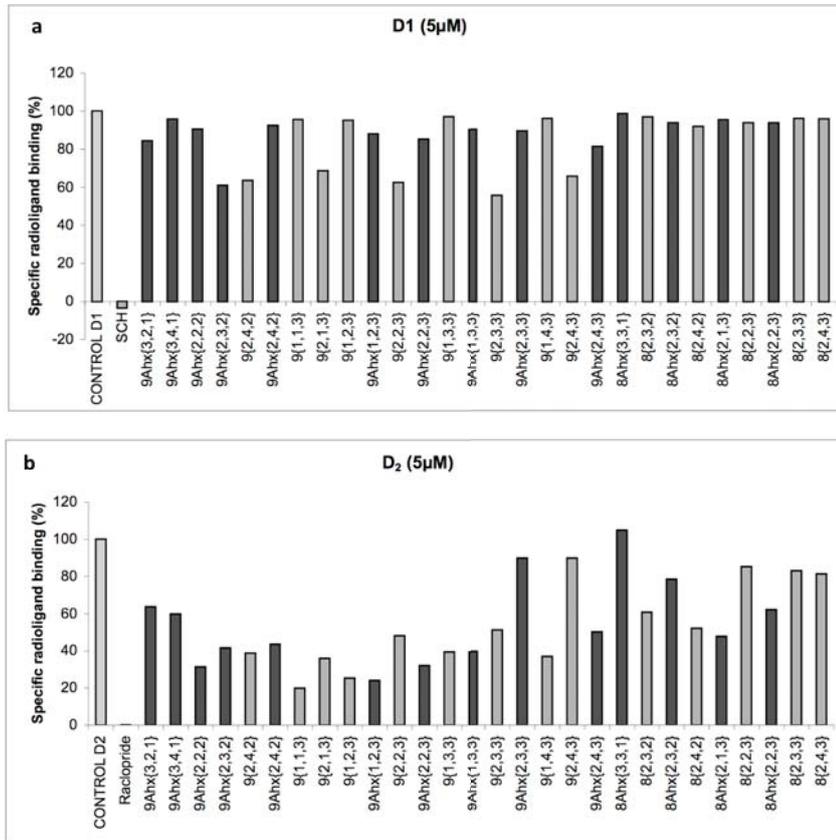


Figura 3. Escombratge dels components de la quimioteca a una concentració de 5 μM. A (a) es mostra la unió específica de l'antagonista del receptor D₁ [³H]SCH 23390 (2 nM) a membranes d'estriat de xai en presència o no de l'antagonista SCH 23390 (50 μM) o de cadascun dels 28 compostos seleccionats de la quimioteca a una concentració de 5 μM. A (b) es mostra la unió específica de l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (2 nM) en presència o no de l'antagonista raclopride (10 μM) o de cadascun dels 28 compostos seleccionats de la quimioteca a una concentració de 5 μM. En gris es mostren els compostos que tenen espaiador.

Per a una millor caracterització, s'han determinat les constants d'afinitat de 10 híbrids indoloquinolizidina-tripèptid que, en l'escombratge, mostraven una certa afinitat tant pels receptors D₁ com pels receptors D₂ (**9Ahx{2,2,2}**, **9Ahx{2,4,2}**, **9{2,1,3}**, **9Ahx{1,2,3}**, **9{2,2,3}**, **9Ahx{1,3,3}**, **9{2,3,3}**, **9Ahx{2,4,3}**, **8{2,4,2}**, **8Ahx{2,1,3}**). S'han realitzat experiments de competició, efectuant corbes de desplaçament emprant membranes d'estriat de xai (0,3-0,5 mg de proteïna/ml), una concentració 2 nM de [³H]SCH 23390 o de [³H]YM-09151-02 i concentracions creixents dels compostos seleccionats. Donat que els receptors D₁ i D₂ de dopamina s'expressen com a homòmers, les dades d'unió de radioligands s'han ajustat al *two-state dimer receptor model* (Franco et al.,

2005; 2006), útil per calcular les constants macroscòpiques de dissociació a l'equilibri. Les corbes de competició per al receptor D₁ eren monofàsiques en tots els cassos i, per tant, els valors d'unió s'han ajustat a l'Eq. 5 (veure *Materials i mètodes*), obtenint-se els valors de la constant de l'equilibri de dissociació (K_{DB}) que s'indiquen a la Taula 1. S'observa que l'afinitat de tots els compostos és baixa pel receptor D₁, aproximadament entre 1 i 40 μ M. Tal com es mostra a la Taula 1, l'afinitat dels híbrids *trans*-indoloquinolizidina-pèptid (**9Ahx**{2,2,2}, **9Ahx**{2,4,2}, **9**{2,1,3}, **9Ahx**{1,2,3}, **9**{2,2,3}, **9Ahx**{1,3,3}, **9**{2,3,3} i **9Ahx**{2,4,3}) és més baixa que els dels derivats *cis* (**8**{2,4,2} i **8Ahx**{2,1,3}), un fet que està d'acord amb estudis previs (Silberstein et al., 2003). Respecte al receptor D₂, alguns compostos donaren lloc a corbes de competició monofàsiques i, consegüentment s'han ajustat a l'Eq. 5. Per altres compostos les corbes de competició eren bifàsiques indicant cooperativitat; es a dir, la unió del compost a un receptor de l'homodímer afecta negativament la unió del mateix compost a l'altre receptor de l'homodímer. En aquests cassos les dades s'han ajustat a l'Eq. 2 (veure *Material i mètodes*) d'on s'han obtingut els paràmetres K_{DB1} i K_{DB2} (Taula 1).

Taula 1. Paràmetres farmacològics deduïts a partir dels experiments de competició.

Experiments de competició	Receptor D ₁		Receptor D ₂	
	Compost	K_{DB1} (μ M)	K_{DB1} (μ M)	K_{DB2} (μ M)
8 {2,4,2}		27,3	-	5,0
8 {2,1,3}		38,5	-	6,3
9Ahx {1,2,3}		2,9	0,24	6,3
9Ahx {1,3,3}		15,4	0,28	9,4
9 {2,1,3}		1,18	-	4,7
9Ahx {2,2,2}		3,4	0,56	18,9
9 {2,2,3}		1,9	0,90	15,8
9 {2,3,3}		1,3	0,19	7,8
9Ahx {2,4,2}		3,9	0,48	11,8
9Ahx {2,4,3}		3,3	-	2,3

Els valors són la mitjana \pm SD de 3 determinacions. K_{DB1} i K_{DB2} són respectivament les constants d'equilibri de la dissociació de la unió de la primera i la segona molècula de lligand competidor al dímer.

3.3 Caracterització farmacològica del compost **9Ahx**{1,3,3} com a lligand dels receptors de dopamina.

Considerant les dades mostrades a la Taula 1, es va escollir el compost **9Ahx**{1,3,3} per a dur-ne a terme una caracterització química i bioquímica més exhaustiva. En tornar a sintetitzar el compost i després de la purificació, es van aïllar dos diastereoisòmers. Les estructures de indolo[2,3-a]quinolizidina

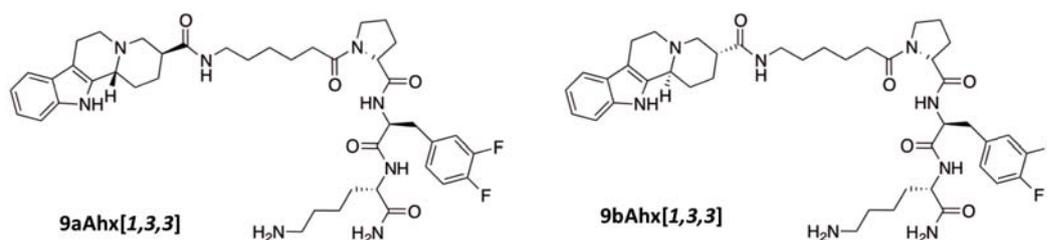


Figura 4. Estructures dels compostos **9aAhx{1,3,3}** i **9bAhx{1,3,3}**.

utilitzades en la síntesi de la quimioteca eren mescles racèmiques (Fig. 1) i, per tan, l'addició del tripèptid i l'espaiador genera dos diastereoisòmers en cada cas. En la quimioteca de 80 membres no era viable aïllar els diastereoisòmers però, en canvi, la síntesi a més gran escala del compost **9Ahx{1,3,3}** i la seva purificació permet la separació dels diastereoisòmers **9aAhx{1,3,3}** i **9bAhx{1,3,3}** (Fig. 4).

Per a la caracterització bioquímica, s'han dut a terme assajos de competició com els descrits més amunt amb aquests dos compostos. S'han emprat membranes d'estriat de xai (0,3-0,5 mg de proteïna/ml), que s'han incubat amb l'antagonista del receptor D₁ [³H]SCH 23390 (2 nM) o amb l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (2 nM) i concentracions creixents (9 concentracions entre 1 nM i 50 μM) dels productes **9aAhx{1,3,3}** o **9bAhx{1,3,3}**. Les corbes de competició es mostren a la Fig. 5 i l'ajust a l'Eq. 5 per a la unió als receptors D₁ o a l'Eq 2 per a la unió al receptor D₂ (veure *Materials i mètodes*) permet calcular els paràmetres que caracteritzen la unió i que es mostren a la Taula 2..

Taula 2. Paràmetres farmacològics dels compostos **9aAhx{1,3,3}** i **9bAhx{1,3,3}** deduïts a partir dels experiments de competició.

Experiments de competició	K_{DB1} (nM)	K_{DB2} (μM)
[³ H]SCH 23390 vs		
9aAhx{1,3,3}	1500 ± 900	
9bAhx{1,3,3}	1600 ± 800	
[³ H]YM-09151-02 vs		
9aAhx{1,3,3}	207 ± 105	3,7 ± 1,6
9bAhx{1,3,3}	387 ± 224	14 ± 5,6

Els valors són la mitjana ± SD de 3 determinacions. K_{DB1} i K_{DB2} són respectivament les constants d'equilibri de la dissociació de la unió de la primera i la segona molècula de lligand competidor al dímer.

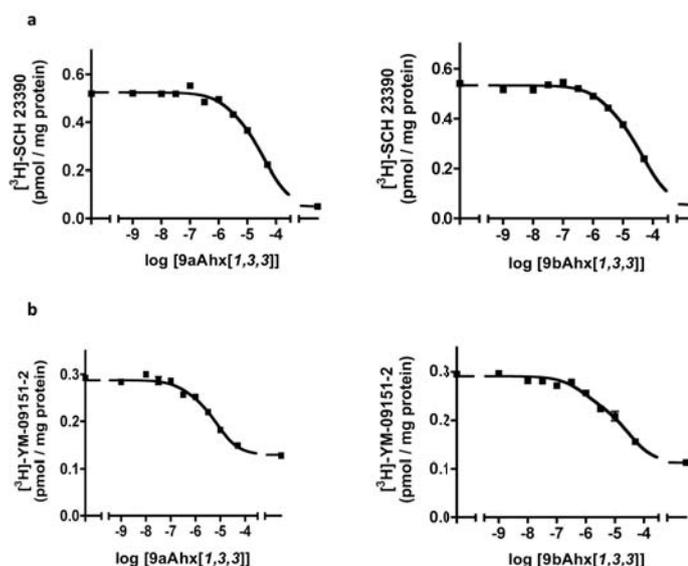


Figura 5. Corbes de competició dels compostos 9aAhx{1,3,3} i 9bAhx{1,3,3}. S'han realitzat experiments de competició en membranes d'estriat de xai a una concentració constant dels antagonistes del receptor D₁ [³H]SCH 23390 (a) o del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (b) i concentracions creixents dels compostos 9aAhx{1,3,3} (dreta) i 9bAhx{1,3,3} (esquerra). Els valors que es mostren són la mitjana ± SEM d'un experiment representatiu realitzat en triplicats.

El compost 9aAhx{1,3,3} presenta una afinitat moderadament bona i una certa selectivitat per al receptor D₂. Per a evaluar si la seva unió al receptor D₂ és al centre ortoestèric o bé pot actuar com un modulator al·lostèric, s'han realitzat assajos cinètics de dissociació. Les membranes d'estriat de xai (0,2 mg de proteïna/ml) s'han incubat durant 120 min amb l'antagonista del receptor D₂ marcat radioactivament [³H]YM-09151-02 en presència o no d'una concentració 3 μM del compost 9aAhx{1,3,3}. La dissociació s'ha iniciat per addició de 10 μM de YM-09151-02. A cada temps indicat (en un total de 18 intervals de temps) s'ha determinat la unió del radiolligand per filtració ràpida, tal com s'ha indicat per als experiments de competició (veure *Materials i mètodes*). La unió inespecífica s'ha determinat després de 90 min d'incubació del lligand radioactiu en presència de YM-09151-02 50 μM. Tal com es mostra a la Taula 3, la presència del compost 9aAhx{1,3,3} no canvia significativament la constant cinètica de dissociació (K_{off}) del lligand ortostèric YM-09151-02 i per tant, no es pot assegurar que l'híbrid indoloquinolizidina-pèptid actuï com un modulator al·lostèric.

Taula 3. Valors de les constants cinètiques de dissociació per a l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 en presència o no de 3 μM de 9aAhx{1,3,3}.

Experiments de dissociació de [³ H]YM-09151-02	Paràmetres			
	B ₁ (pmol/mg prot)	K _{off1} (min ⁻¹)	B ₂ (pmol/mg prot)	K _{off1} (min ⁻¹)
CONTROL	0,21 ± 0,01	0,018 ± 0,002	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,02
+ 9aAhx{1,3,3} 3 μM	0,13 ± 0,02	0,018 ± 0,004	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,03

Els valors són la mitjana ± SD de 3 experiments. K_{off1} i K_{off2} són respectivament les constants cinètiques de dissociació de la unió de la primera i la segona molècula de lligand.

3.4 Caracterització funcional del compost 9aAhx{1,3,3} com a lligand dels receptors D₂ de dopamina.

Per tal d'identificar el comportament del compost 9aAhx{1,3,3} a nivell funcional, s'ha determinat la fosforilació d'ERK1/2 en cèl·lules CHO transfectades transitòriament amb el cDNA del receptor D₂ (1 μg / flascó; veure *Materials i mètodes*). Les cèl·lules es van estimular amb l'agonista del receptor D₂ quinpirole (100 nM) com a control positiu o amb l'antagonista YM-09151-02 (1 μM) com a control negatiu o bé amb concentracions creixents del compost 9aAhx{1,3,3}. El compost 9aAhx{1,3,3} estimula la fosforilació d'ERK1/2 de manera dependent de concentració (Fig. 6), és a dir, actua com un agonista del receptor D₂. La presència combinada de l'antagonista YM-09151-02 i de l'híbrid indoloquinolizidina-tripèptid no estimula la fosforil·lació d'ERK1/2, indicant que l'YM-09151-02 antagonitza l'efecte del compost 9aAhx{1,3,3} competint pel seu lloc d'unió (Fig. 6).

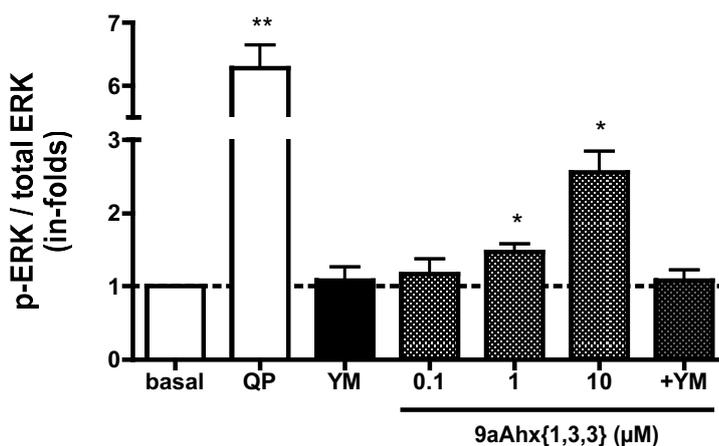


Figura 6. Fosforilació d'ERK1/2 estimulada pel compost 9aAhx{1,3,3}. S'ha determinat la fosforil·lació d'ERK1/2 tal com s'ha descrit a *Materials i mètodes* en cèl·lules CHO transfectades transitòriament amb el receptor D₂ de dopamina i estimulades durant 5 min amb l'agonista del receptor D₂ quinpirole (100 nM), l'antagonista YM-09151-02 (1 μM) o concentracions creixents del compost 9aAhx{1,3,3}, en presència o no de l'antagonista YM-09151-02 (1 μM). Els valors (increments respecte al basal) són la mitjana ± SEM de 4 a 6 experiments.

3.5 Discussió

L'esquelet de la indolo[2,3-*a*]quinolizidina es troba en una gran nombre de compostos naturals que tenen un ampli rang d'activitats biològiques i, per tant, ha atret un cert interès al llarg dels darrers anys (Wenkert et al., 1965; Belle et al., 1996; Lounasmaa et al., 1998). Alguns d'aquets alcaloids policíclics (com la eburnamina, corianteïdina, yohimbina i la reserpina) intervenen en un ample ventall d'efectes fisiològics i s'han utilitzat per a propòsits farmacèutics com a agents antiparàsits, antivirals, analgèsics o fins i tot antihipertensius (Watanabe et al., 1997; Staerk et al., 2000; Muller et al., 1952). L'activitat biològica de la indolo[2,3-*a*] quinolizidina al SNC pot ser deguda a la similitud estructural de l'anell alcaloide amb algunes amines biogèniques com la dopamina i la serotonina. De fet, l'any 1986 es va publicar per primer cop la interacció d'estructures derivades de la indoloquinolizidina amb receptors de serotonina (Lounasmaa et al., 1986). La combinació d'aquesta molècula amb diferents tripèptids ha portat a l'obtenció de lligands amb especificitat múltiple per als receptors D₁ i D₂ de dopamina i no per altres receptors com els de serotonina (Vendrell et al., 2009; Soriano et al., 2010) o d'adenosina (resultats no mostrats). Alguns d'aquests mostraven certa afinitat per als receptors de dopamina sense la porció peptídica, però s'ha vist que aquesta part de la molècula era un punt clau per a modular l'afinitat de la unió dels compostos (Vendrell et al., 2009). En aquest estudi s'ha dissenyat una nova quimioteca tenint en compte els resultats anteriors (Vendrell et al., 2009). Els resultats de l'escombratge de la quimioteca sobre els receptors D₁ i D₂ de dopamina indiquen que la unió dels compostos s'empitjora quan el tripèptid inclou un aminoàcid amb càrrega negativa, per contra, aquesta unió es veu millorada quan hi ha un aminoàcid carregat positivament. Els receptors de dopamina tenen càrregues negatives als bucles extracel·lulars i aquestes interaccions electrostàtiques son importants per a la interacció del compost amb les zones del voltant del centre ortoestèric. També s'ha observat una forta influència de l'esteroquímica de la molècula d'indoloquinolizidina. Els derivats *cis* (identificats amb el número **8**) mostren afinitats relativament moderades o baixes, mentre que els derivats *trans* (identificats amb el número **9**) presenten afinitats més altes per als receptor D₂ de dopamina. L'espaiador alifàtic Ahx (aminohexanoic) confereix una certa mobilitat al pèptid per a l'adaptació al receptor, és a dir, que els tripèptid pugui interaccionar amb zones més allunyades del centre actiu on s'uneix l'anell alcaloide. Malgrat això, la incorporació d'aquest espaiador no sembla afectar significativament a l'afinitat

dels compostos; en alguns casos la seva presència no afecta a l'afinitat dels compostos i en altres només l'afecta lleugerament, tant positivament com negativa. La majoria dels compostos analitzats més exhaustivament, mostren una certa selectivitat per als receptors D₂, amb constats d'afinitat relativament baixes i amb presència de cooperativitat en alguns casos.

Dels 80 compostos de la quimioteca s'ha seleccionat el compost **9Ahx{1,3,3}** ja que presentava una afinitat i selectivitat bona per als receptors D₂ de dopamina. La síntesi a més gran escala d'aquest compost ha permès aïllar-ne dos diastereoisòmers, generats com a conseqüència de la síntesi a partir d'una mescla racèmica de l'estructura *trans* de la indolo[2,3-*a*]quinolizidina. Ambdós compostos mantenen el perfil d'afinitat i selectivitat detectat en les determinacions preliminars, tot i que el compost **9aAhx{1,3,3}** és significativament més afí per als receptors D₂ de dopamina.

Altres derivats de la indoloquinolizidina analitzats en altres estudis (Soriano et al., 2010) no s'unien al centre ortoestèric dels receptors sinó a centres al·lostèrics, que s'han descrit anteriorment per als receptors de dopamina (Schetz, 2005). El fet de que s'uneixi a un centre al·lostèric podria significar una capacitat per modular el receptor preservant la rellevància fisiològica del neurotransmissor endògen i afectant només a la potència de la senyalització (Conn et al., 2009). Per estudiar el lloc d'unió del compost **9aAhx{1,3,3}** s'han realitzat assajos cinètics de dissociació de l'antagonista YM-09151-02 en presència o no d'aquest compost. En ambdós casos la velocitat de dissociació de l'antagonista YM-09151-02 es manté constant, això significa o bé que ambdós lligands s'uneixen al mateix centre ortostèric o bé que la unió del compost **9aAhx{1,3,3}** a un centre al·lostèric no modificaria l'estructura del receptor de manera que afecti a la forma del centre ortoestèric.

Per aprofundir en la caracterització biològica d'aquest compost s'han realitzat estudis de fosforilació de ERK1/2 en cèl·lules CHO transfectades transitòriament amb els receptors D₂. El compost **9aAhx{1,3,3}** induïx la fosforilació d'ERK1/2 de forma dosi-dependent en cèl·lules que expressen el receptor D₂. L'activació del receptor D₂ per **9aAhx{1,3,3}** es dóna de manera menys efectiva que la produïda per l'agonista quinpirole, suggerint el seu paper com agonista parcial. A més, la presència de l'antagonista YM-09151-02 impedeix l'estimulació de la fosforilació de ERK1/2 induïda per **9aAhx{1,3,3}**, un fet que indicaria que ambdós lligands competeixen per un mateix lloc d'unió, que seria el lloc ortoestèric i que el compost **9aAhx{1,3,3}** podria ser un

agonista parcial dels receptors D₂. Per algun receptor de dopamina s'ha descrit la paradoxa de que una activació insuficient o excessiva pot ser contraproductiu pel SNC i que es necessita una activació "òptima", moderada, pel seu funcionament correcte (Goldman-Rakic et al., 2000; Bubenikova-Valesova et al., 2009). El disseny de fàrmacs estimuladors tendeix a la consecució de compostos altament efectius i es pot donar el cas que això no sigui el més desitjable. Avui en dia, els agonistes parcials s'estan obrint un camp nou dins de la farmacologia com a compostos òptims per assolir l'activació moderada de receptors i, en aquest sentit, **9aAhx{1,3,3}** podria ser un precursor per trobar aquest tipus de lligand.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 3

- [1] Andersen PH, Nielsen, E.B. Novel approaches to development of antipsychotics. *Drug News Perspect* 1991;4:150-7.
- [2] Belle DD, Tolvanen, A., Lounasmaa, M. . Total syntheses of tacamine-type indole alkaloids of *Tabernaemontana glandulosa*. *Tetrahedron* 1996;52 (34):11361-78.
- [3] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, et al. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 2006;69:1905-12.
- [4] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, et al. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem Sci* 2005;30:360-6.
- [5] Gerfen CR. *Basal Ganglia*: Elsevier Academic Press, 2004.
- [6] Kim J, Jiang Q, Glashofer M, Yehle S, Wess J, Jacobson KA. Glutamate residues in the second extracellular loop of the human A2a adenosine receptor are required for ligand recognition. *Mol Pharmacol* 1996;49:683-91.
- [7] Kim J, Wess J, van Rhee AM, Schoneberg T, Jacobson KA. Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. *J Biol Chem* 1995;270:13987-97.
- [8] Lounasmaa M. Synthetic studies in the field of indole alkaloids. Part 3. *Curr Org Chem* 1998;2 (1):63-90.
- [9] Lounasmaa M, Saano V, Airaksinen MM, Jokela R, Huhtikangas A. Indoloquinolizidines, formal derivatives of tetrahydro-beta-carbolines, show selective affinity for benzodiazepine, tryptamine and serotonin binding sites in rat brain. *Neuropharmacology* 1986;25:915-8.
- [10] Muller JM, Schlittler E, Bein HJ. [Reserpin, the sedative principle from *Rauwolfia serpentina* B]. *Experientia* 1952;8:338.
- [11] Schetz JA. Allosteric modulation of dopamine receptors. *Mini Rev Med Chem* 2005;5:555-61.
- [12] Shi L, Javitch JA. The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:440-5.
- [13] Silberstein SD, McCrory DC. Ergotamine and dihydroergotamine: history, pharmacology, and efficacy. *Headache* 2003;43:144-66.
- [14] Soriano A, Vendrell M, Gonzalez S, Mallol J, Albericio F, Royo M, et al. A hybrid indoloquinolizidine peptide as allosteric modulator of dopamine D1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332:876-85.
- [15] Staerk D, Christensen J, Lemmich E, Duus JO, Olsen CE, Jaroszewski JW. Cytotoxic activity of some phenanthroindolizidine N-oxide alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*. *J Nat Prod* 2000;63:1584-6.
- [16] Vendrell M, Angulo E, Casado V, Lluís C, Franco R, Albericio F, et al. Novel ergopeptides as dual ligands for adenosine and dopamine receptors. *J Med Chem* 2007;50:3062-9.

- [17] Vendrell M, Soriano A, Casado V, Diaz JL, Lavilla R, Canela EI, et al. Indoloquinolizidine-peptide hybrids as multiple agonists for D1 and D2 dopamine receptors. *ChemMedChem* 2009;4:1514-22.
- [18] Watanabe K, Yano S, Horie S, Yamamoto LT. Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor. *Life Sci* 1997;60:933-42.
- [19] Wenkert E, Dave KG, Haglid F. General methods of synthesis of indole alkaloids. V. Syntheses of d,l-corynantheidol and d,l-epialloyohimbane. *J Am Chem Soc* 1965;87:5461-7.
- [20] Wu WL, Burnett DA, Spring R, Greenlee WJ, Smith M, Favreau L, et al. Dopamine D1/D5 receptor antagonists with improved pharmacokinetics: design, synthesis, and biological evaluation of phenol bioisosteric analogues of benzazepine D1/D5 antagonists. *J Med Chem* 2005;48:680-93.

CAPÍTOL 4

La Cocaïna Inhibeix la Senyalització del Receptor D₂ a través dels Heteròmers de Receptors σ_1 -D₂.

Els mecanismes que porten a l'addició a la cocaïna són diversos, però uns dels principals responsables en són les vies dopaminèrgiques i particularment les neurones estriatals eferents (Kalivas i Volkow, 2005; DiChiara i Bassareo, 2007). En un principi es pensava que l'únic receptor involucrat en l'addicció a cocaïna era el receptor D₁ de dopamina ja que l'activació d'aquests receptors és un requeriment absolut per a la inducció de les respostes cel·lulars i comportamentals a la cocaïna, tal com es demostrava en estudis en ratolins KO per al receptor D₁ (Xu et al., 1994). Aquests resultats es confirmaren amb estudis usant ratolins transgènics en què les neurones GABAèrgiques, que contenen els receptors D₁ o D₂, eren visualitzades mitjançant proteïnes de fusió fluorescents, mostrant que la resposta aguda a cocaïna involucrava principalment les neurones que expressaven el receptor D₁ (Bertran-González et al., 2008). De totes maneres, estudis més recents dels esdeveniments que ocorren a més llarg termini han demostrat que ambdós tipus neuronals, tant les que expressen D₁ com les que expressen D₂, juguen un paper en l'addicció (Luo et al., 2011). A més, s'ha mostrat que es requereixen els receptors D₂ per millorar els efectes de recompensa de la cocaïna (Welter et al., 2007). En animals mutants -/- per D₂, l'alliberament de dopamina provocat per injecció de cocaïna és molt més alt comparat amb el dels animals WT i es requereix una senyalització per D₂ intacta per mostrar els efectes de recompensa de la cocaïna (Rougé-Pont et al., 2002). Aquests estudis i altres confirmen un paper dels receptors D₂, tant presinàptics com postsinàptics, en els efectes induïts per la cocaïna (De Mei et al., 2009; Asensio et al., 2010). En estudis de com la cocaïna altera els efectes neuromoduladors, l'increment a GABA_A-IPSC passa de ser mitjançat per D₂ a ser mitjançat per D₁ en rates tractades amb cocaïna

(Krawczyk et al., 2011), i en models d'addicció a llarg termini s'ha vist que els nivells de D_1 augmenten i els de D_2 disminueixen (Thompson et al., 2010). Així doncs, si es requereix el receptor D_2 per a l'addicció a cocaïna però els nivells d'expressió d'aquest disminueixen al llarg del temps en relació a D_1 , com s'acompleixen els efectes del receptor D_2 als estadis inicials d'exposició a la cocaïna i com podrien aquests efectes inicials representar un paper en l'addicció?

Els primers esdeveniments moleculars en la unió de cocaïna i els seus efectes en aquestes dues poblacions neuronals estriatals encara no estan del tot entesos. El que se sap és que la cocaïna pot augmentar els nivells de dopamina a l'estriat (De Mei et al., 2009), la qual cosa s'aconsegueix mitjançant el bloqueig del transportador presinàptic DAT (Beuming et al., 2008). Però, tal com s'ha comentat anteriorment, la cocaïna també pot unir-se als heteròmers formats pels receptors D_1 i σ_1 (Navarro et al., 2010). A través d'aquesta interacció la cocaïna potencia robustament l'activació d'adenilat ciclasa mediada pel receptor D_1 , indueix la fosforilació de ERK1/2 per si mateixa i contraresta l'activació de les MAPK induïda per estimulació del receptor D_1 (Navarro et al., 2010).

L'objectiu d'aquest capítol, que es correspon amb l'Objectiu 4 d'aquesta tesi que ha estat estudiar els esdeveniments moleculars inicials que ocorren després de l'exposició a cocaïna a través de la família D_2 -like de receptors de dopamina i la seva interacció amb els receptors σ_1 . Els resultats d'aquest capítol formen part del treball **Cocaine inhibits D2 receptor signaling via sigma-1-dopamine D2 receptor heteromers** per Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, Brugarolas M, Farré D, Mallol J, Cortés A, Casadó V, Lluís C, Ferré S, Franco R, Canela EI, McCormick PJ. que està sotmés a revisió a *Journal of Neuroscience*.

4.1 Els receptors σ_1 formen heteròmers amb els receptors D_2 de dopamina però no amb els altres membres de la família D_2 -like.

En primer lloc s'ha examinat si els receptors de la família D_2 -like poden interaccionar directament amb els receptors σ_1 i per tant ser una diana per a la unió de cocaïna. Per a aquesta finalitat, s'ha utilitzat la tecnologia de BRET en cèl·lules HEK-293 transfectades transitòriament, tal com s'ha descrit anteriorment, per expressar una quantitat constant (veure peu Fig. 1) de les proteïnes de fusió corresponents als receptors de dopamina D_2 (isoforma llarga), D_3 o D_4 fusionades a *RLuc* i quantitats creixents (veure peu Fig. 1) de σ_1

fusionat a YFP. S'han obtingut corbes clares de saturació de BRET per a les cèl·lules que expressen els receptors D_2 -*RLuc* i quantitats creixents de σ_1 -YFP, obtenint un valor de $BRET_{max}$ de 55 ± 7 mBU i $BRET_{50}$ de 28 ± 6 (Fig. 1a). En canvi en cèl·lules que expressen D_3 -*RLuc* o D_4 -*RLuc* i σ_1 -YFP s'ha obtingut un senyal de BRET lineal i no específic, confirmant l'especificitat de la interacció entre D_2 -*RLuc* i σ_1 -YFP (Fig. 1b). Com un altre control negatiu, les cèl·lules s'han cotransfectat amb σ_1 -YFP i la proteïna de fusió derivada del receptor d'adenosina A_{2A} -*RLuc* i no s'ha obtingut senyal de BRET específic (Fig. 1a). Aquests resultats indiquen que els receptors σ_1 interaccionen selectivament amb els receptors D_2 de dopamina i no amb els altres membres de la família *D₂-like*.

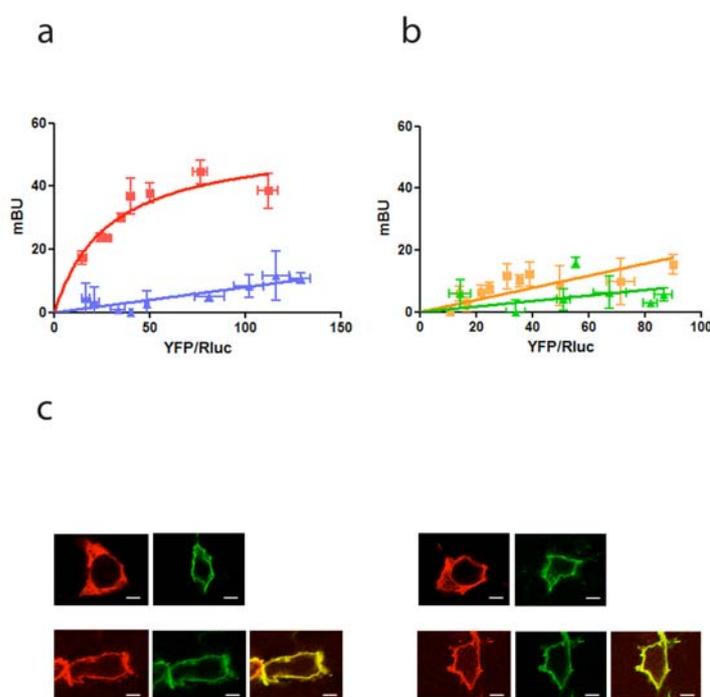


Figura 1. Interacció molecular entre els receptors σ_1 i D_2 en cèl·lules vives.

S'han realitzat experiments de saturació de BRET amb cèl·lules HEK-293 cotransfectades amb els cDNA corresponents a: (a) D_2 -*RLuc* (0.4 μ g; quadrats) o A_{2A} -*RLuc* (0.2 μ g; triangles), com a control negatiu, i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.1 a 1 μ g), (b) D_3 -*RLuc* (0.5 μ g; quadrats) o D_4 -*RLuc* (0.5 μ g; triangles), i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.1 a 1 μ g) (veure *Materials i mètodes*). Les dades de BRET es mostren com a mitjana \pm SD de 5 o 6 experiments diferents agrupats en funció de la quantitat d'acceptor de BRET. A (c) es mostren les imatges de microscopia confocal de les cèl·lules transfectades amb D_2 -YFP o σ_1 -*RLuc* (panells superiors) o cotransfectades amb D_2 -YFP i σ_1 -*RLuc* (panells inferiors) i tractades (dreta) o no (esquerra) amb cocaïna 30 μ M durant 30 min. Els receptors σ_1 (vermell) s'identifiquen per immunocitoquímica i els receptors D_2 (verd) per la seva pròpia fluorescència; la colocalització es mostra en groc. Barra d'escala: 10 μ m.

Els receptors σ_1 es troben principalment al reticle endoplasmàtic i a la membrana plasmàtica (Hayashi i Su, 2005) i s'hipotitza que poden actuar com a una xaperona. L'expressió de σ_1 i D_2 a nivell de membrana plasmàtica s'ha estudiat analitzant la colocalització d'ambdós receptors per microscopia confocal. Per aquest assajos s'han usat les cèl·lules HEK-293 ja que expressen constitutivament els receptors σ_1 i no DAT (Navarro et al., 2010). Com s'esperava, s'ha trobat una tinció puntuada del receptor σ_1 en les cèl·lules no tractades o tractades amb cocaïna (30 μ M, 30 min; ; cocaïna-HCl, Agencia del Medicamento no: 2003C00220, Espanya; Fig 1c, imatges superiors). A les cèl·lules transfectades amb els receptors D_2 -YFP, s'ha observat colocalització amb els receptors σ_1 tant en les cèl·lules tractades amb cocaïna (30 μ M; 30 min) com en les no tractades (Fig. 1c, imatges inferiors).

4.2 Formació de complexos d'ordre superior entre els receptors σ_1 i els receptors D_2 de dopamina.

Les estructures cristal·lines obtingudes recentment han demostrat la formació d'homodímers de GPCR, un fet que s'ha confirmat pels receptors D_2 de dopamina (Ng et al., 1996; Lee et al., 2000; Armstrong et al., 2001; Guo et al., 2003, 2008). Considerant que el σ_1 pot actuar com a una xaperona s'ha investigat la possible formació de complexos d'ordre superior entre els homodímers del receptor D_2 i σ_1 . Per avaluar-ho, era necessari saber si el receptor σ_1 per la seva banda podia formar homodímers, un fet que no ha estat publicat anteriorment. Per comprovar-ho s'han realitzat experiments de BRET en cèl·lules HEK-293 que expressen una quantitat constant de σ_1 -RLuc i quantitats creixents de σ_1 -YFP. S'ha obtingut un senyal de BRET positiu i saturable amb uns valors de $BRET_{max}$ de 165 ± 35 mBU i un $BRET_{50}$ de 22 ± 12 (Fig. 2a) indicant que els homodímers σ_1 - σ_1 poden existir i demostrant, per primer cop, l'oligomerització de receptors σ_1 . Seguidament, s'ha provat si els receptors homomèrics D_2 poden interaccionar amb els receptors σ_1 per una tècnica que combina BRET i FRET anomenada SRET (Sequential Resonance Energy Transfer; Carriba i Navarro et al., 2008; veure *Materials i mètodes*). En cèl·lules HEK-293 que expressen una quantitat constant de les proteïnes de fusió D_2 -RLuc i D_2 -GFP² i quantitats creixents de σ_1 -YFP, s'ha obtingut una corba de saturació de SRET amb un valor de $SRET_{max}$ de 269 ± 33 SU i un $SRET_{50}$ de 92 ± 24 (Fig. 2b). Com a control negatiu, en cèl·lules que expressen quantitats constants dels receptors A_{2A} -RLuc i A_{2A} -GFP² i quantitats creixents de σ_1 -YFP s'ha obtingut un senyal de SRET molt

baix i lineal. Aquests resultats demostren que els receptors σ_1 poden formar heteròmers amb els dímers D_2 - D_2 . També s'ha obtingut una corba de saturació de SRET en cèl·lules HEK-293 que expressen quantitats constants de σ_1 -*RLuc* i D_2 -GFP² i quantitats creixents de σ_1 -YFP (SRET_{max} = 140 ± 8 SU; SRET₅₀ = 9 ± 3) però no quan s'ha substituït D_2 -GFP² per A_{2A} -GFP² (Fig 2c). Aquests resultats demostren que els receptors D_2 poden formar heteròmers amb els dímers σ_1 - σ_1 . Finalment s'ha comprovat si era possible una interacció d'ordre superior entre els homòmers σ_1 - σ_1 i els homòmers D_2 - D_2 . Per fer-ho, s'han realitzat un assaig de BRET modificat on tan el donador com l'acceptor de BRET estan constituïts per dues proteïnes fusionades a dues meitats de la proteïna *RLuc 8* o a dues meitats de la proteïna YFP Venus capaces de complementar (Guo et al., 2008). Es mostra un diagrama explicatiu d'aquest assaig a la Figura 2d (veure *Materials i mètodes*). Les cèl·lules HEK-293 es'han transfectat amb una quantitat constant dels cDNA corresponents a D_2 -*nRLuc8* i D_2 -*cRLuc8* (igual quantitat d'ambdós cDNA) i amb una quantitat constant dels cDNA corresponents a σ_1 -*nVenus* i σ_1 -*cVenus* (en quantitats iguals d'ambdós). En aquestes condicions, únicament seria possible detectar BRET si *RLuc* es reconstituís per la dimerització de D_2 -*nRLuc8* i D_2 -*cRLuc8* i fós suficientment a prop de la proteïna YFP Venus reconstituïda per interacció entre σ_1 -*nVenus* i σ_1 -*cVenus*. De fet, els heterotetràmers s'han evidenciat amb l'obtenció d'un senyal de BRET positiu (Fig. 2d). Com a controls negatius s'han usat cèl·lules que expressen només tres proteïnes de fusió i el quart receptor no fusionat, en les quals no s'ha obtingut cap senyal fluorescent ni de BRET (Fig. 2d). Col·lectivament, aquests resultats indiquen que els receptors heteromèrics σ_1 - D_2 semblen estar constituïts per la interacció entre els homodímers d'ambdós receptors i que la seva unitat estructural mínima és el receptor heterotetramèric σ_1 - σ_1 - D_2 - D_2 .

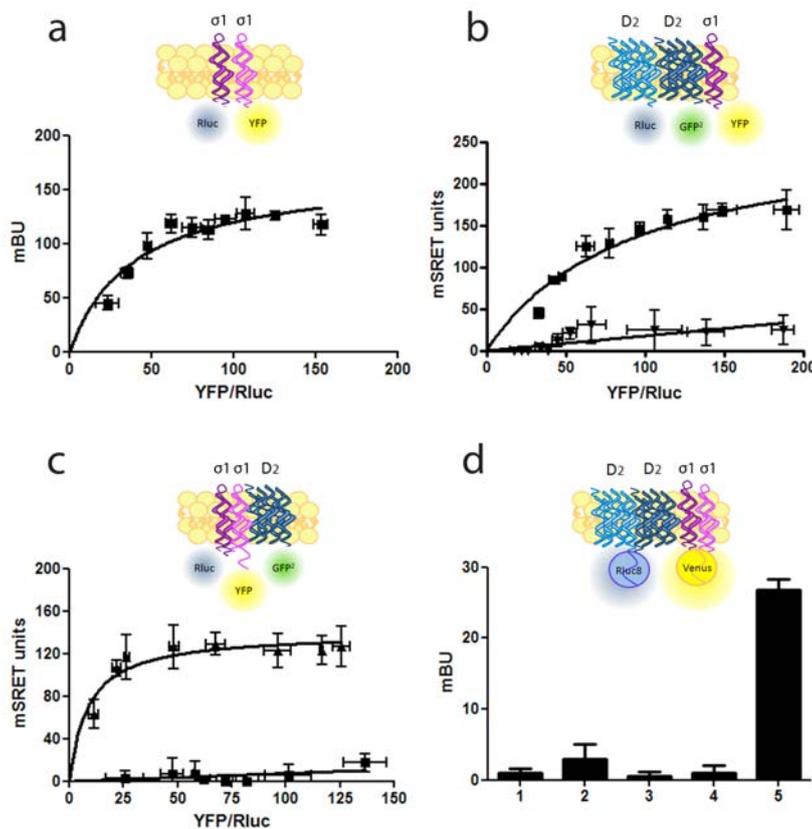


Figura 2. Formació de complexos d'ordre superior entre els receptors σ_1 i D_2 en cèl·lules vives. S'han realitzat experiments de saturació de BRET amb cèl·lules HEK-293 cotransfectades amb els cDNA corresponents a σ_1 -RLuc (0.2 μ g), i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.1 a 1 μ g) (a). S'han realitzat experiments de SRET en cèl·lules transfectades amb: (b; quadrats) D_2 -RLuc (0.6 μ g) i D_2 -GFP² (1 μ g) o amb (b; triangles) A_{2A} -RLuc (0.3 μ g) i A_{2A} -GFP² (0.5 μ g), i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.2 a 1.5 μ g). També s'han realitzat experiments de SRET amb cèl·lules transfectades amb: (c) σ_1 -RLuc (0.3 μ g) i D_2 -GFP² (1 μ g; triangles) o A_{2A} -GFP² (0.5 μ g; quadrats), i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.2 a 1.5 μ g). (veure *Materials i mètodes*). A (d) es mostren els experiments de BRET amb complementació de luminiscència i fluorescència realitzats en cèl·lules transfectades amb 1 μ g de cadascun dels cDNA corresponents a D_2 -nRLuc8 i D_2 -cRLuc8 i amb 1.5 μ g dels cDNA de σ_1 -nVenus i σ_1 -cVenus (5) i com a control negatiu les cèl·lules transfectades amb les mateixes quantitats de cDNA corresponents a D_2 -nRLuc8 i D_2 -cRLuc8, σ_1 -nVenus i cVenus (1), D_2 -nRLuc8, D_2 -cRLuc8, σ_1 -cVenus i nVenus (2), D_2 -nRLuc8, cRLuc8, σ_1 -nVenus i σ_1 -cVenus (3), D_2 -cRLuc8, nRLuc8, σ_1 -nVenus i σ_1 -cVenus (4) que no mostren en cap cas luminiscència o BRET positiu significatiu. Les dades de BRET o de SRET es mostren com a mitjana \pm SD de 5 o 6 experiments diferents agrupats en funció de la quantitat d'acceptor de BRET o de SRET.

4.3 Efecte dels lligands del receptor σ_1 en l'heterotetràmer σ_1 - D_2 .

Es coneix que la cocaïna pot unir-se a σ_1 (Sharkey et al., 1988; Maurice et al., 2009). Per determinar si la cocaïna pot tenir algun efecte en l'heteròmer σ_1 - D_2 s'han realitzat experiments de BRET en cèl·lules HEK-293 expressant una quantitat constant de receptor D_2 -RLuc i quantitats creixents de σ_1 -YFP en

presència o en absència de cocaïna (30 μ M) o de l'agonista selectiu de σ_1 PRE084 (100 nM; Tocris, Bristol, Regne Unit). La corba de saturació de BRET es redueix (Fig. 3a) quan les cèl·lules es tracten durant 10 min amb PRE084 ($BRET_{max} = 40 \pm 8$ mBU; $BRET_{50} = 31 \pm 6$) o amb cocaïna ($BRET_{max} = 35 \pm 6$ mBU; $BRET_{50} = 26 \pm 8$) indicant que la unió dels lligands als receptors σ_1 indueix algun canvi estructural a l'heteròmer σ_1 -D₂. Per saber si aquests canvis responen a canvis estructurals als homodímers σ_1 - σ_1 , D₂-D₂ o a tots dos, s'han realitzat experiments de BRET, tal com s'han descrit anteriorment, amb cèl·lules que expressaven σ_1 -RLuc i σ_1 -YFP tractant les cèl·lules durant 10 min amb 100 nM de PRE084 o 30 min amb 30 μ M de cocaïna. Tal com es mostra a la Fig. 3b no s'han observat canvis significants en el $BRET_{max}$ ni en el $BRET_{50}$. Per contra, s'ha observat una modificació de la corba de saturació de BRET obtinguda amb D₂-RLuc i D₂-YFP ($BRET_{max} = 44 \pm 3$ mBU; $BRET_{50} = 12 \pm 4$) en tractar les cèl·lules durant 10 min amb PRE084 100 nM ($BRET_{max} = 27 \pm 5$ mBU; $BRET_{50} = 11 \pm 4$) o durant 30 min amb cocaïna 30 μ M ($BRET_{max} = 29 \pm 2$ mBU; $BRET_{50} = 19 \pm 5$; Fig. 3c). Aquests resultats suggereixen canvis en el complex heteromèric provocats tant per la unió del lligand de σ_1 com de per la cocaïna. Per aprofundir en conèixer l'efecte de la cocaïna, s'han realitzat experiments en cèl·lules en les quals l'expressió del receptor σ_1 s'ha reduït usant la tècnica de l'RNA d'interferència (Fig. 3d). Quan s'han transfectat les cèl·lules amb un RNA d'interferència curt i específic (siRNA) s'ha obtingut un silenciament robust de l'expressió de σ_1 (Fig. S1 a l'Apèndix) i aquest tractament ha anul·lat l'efecte de la cocaïna o de PRE084 sobre la corba de BRET (Fig. 3d). Aquest resultat, en conjunt, suggereixen que la unió dels lligands als receptors σ_1 indueix forts canvis en l'estructura dels homodímers D₂-D₂ que formen part dels receptors heteromèrics σ_1 -D₂.

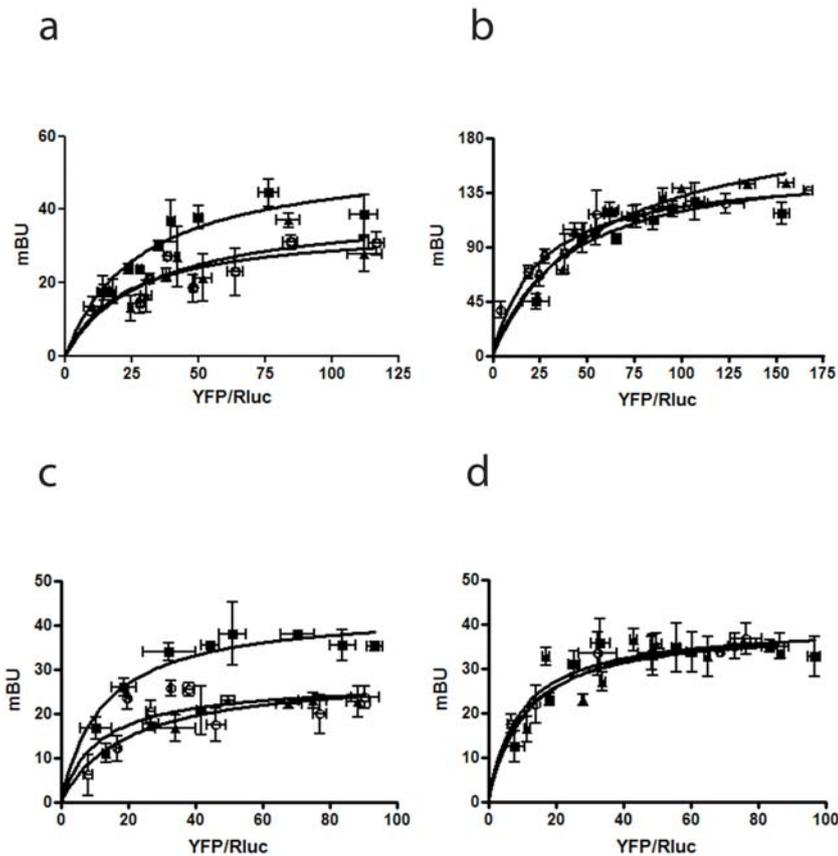


Figura 3. Efecte dels lligands del receptor σ_1 sobre el receptor heteromèric σ_1 -D₂. S'han realitzat experiments de saturació de BRET amb cèl·lules HEK-293 cotransfectades amb els cDNA corresponents a (a) D₂-RLuc (0.4 µg), i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.1 a 1 µg), (b) σ_1 -RLuc (0.2 µg) i quantitats creixents de σ_1 -YFP (de 0.1 a 1 µg), (c i d) D₂-RLuc (0.4 µg), i quantitats creixents de D₂-YFP (de 0.2 a 2 µg) i només a (d) el siRNA de cocaïna (30 µM, cercles) o PRE084 (100 nM; triangles). Les dades de BRET es mostren com a mitjana \pm SD de 4 a 6 experiments diferents agrupats en funció de la quantitat d'acceptor de BRET.

4.4 La unió de cocaïna al receptor σ_1 modula la senyalització del receptor D₂ en cèl·lules transfectades.

Les modificacions induïdes per la cocaïna en l'estructura quaternària dels dímers D₂-D₂ en els heteròmers σ_1 -D₂ suggereixen que la cocaïna pugui modular la funcionalitat dels receptors D₂. Per estudiar com la cocaïna afecta a la senyalització mediada per D₂ s'ha usat cèl·lules CHO, ja que tenen una senyalització basal més baixa. Les cèl·lules CHO expressen constitutivament els receptors σ_1 però no DAT (Navarro et al., 2010). L'efecte de la cocaïna en la senyalització induïda pels agonistes de D₂ i mediada per proteïna G s'ha mesurat mitjançant un tipus d'assaig sense marcatge (*label free*) que mesura canvis en la

impedància cel·lular quan els receptors s'activen per agonistes (veure *Materials i mètodes*). En cèl·lules CHO que expressen de manera estable els receptors D_2 , concentracions creixents de cocaïna (de 10 nM a 100 μ M) no desencadenen cap senyal mediat per proteïna G (Fig. 4a), comparat amb els receptors patró (veure *Materials i mètodes*). En canvi l'activació dels receptors D_2 amb l'agonista quinpirole (de 0.1 nM a 1 μ M) mostra un perfil de senyalització característic de G_i (increments en l'impedància) que es veu totalment bloquejat quan es tracten les cèl·lules amb toxina pertusis (PTx; Fig. 4b). S'ha observat un petit però significat descens en l'activació de G_i induïda per quinpirole en les cèl·lules han estat pretractades durant 1 hora amb cocaïna (Fig. 4c). Aquests resultats indiquen que la cocaïna per si mateixa no és capaç d'induir una senyalització mediada per proteïna G però sí que pot disminuir la capacitat dels receptors D_2 per senyalitzar a través de proteïna G_i . Una conseqüència de l'activació de G_i és la disminució dels nivells d'AMPc. Per tant, s'han determinat els nivells d'AMPc en cèl·lules CHO que expressen de manera estable els receptors D_2 activades amb forskolina (5 μ M) i s'ha estudiat si la cocaïna podia disminuir la formació d'AMPc induïda per la forskolina. Els resultats mostren que la cocaïna no pot fer disminuir directament els efectes de la forskolina en l'acumulació d'AMPc però sí que pot inhibir la disminució d'aquests nivells que causa el quinpirole (Fig. 4d). Aquest efecte s'ha vist bloquejat en cèl·lules transfectades amb el siRNA contra el receptor σ_1 (Fig. 4d) demostrant que l'efecte de la cocaïna sobre la senyalització induïda pel quinpirole es dona a través dels receptors σ_1 . S'han obtingut resultats similars quan enlloc de cocaïna s'ha usat l'agonista del receptor σ_1 PRE084, reforçant el concepte de que els lligands del receptor σ_1 indueixen canvis significatius en la senyalització del receptor D_2 a través de la proteïna G_i (Fig. S2, a l'Apèndix).

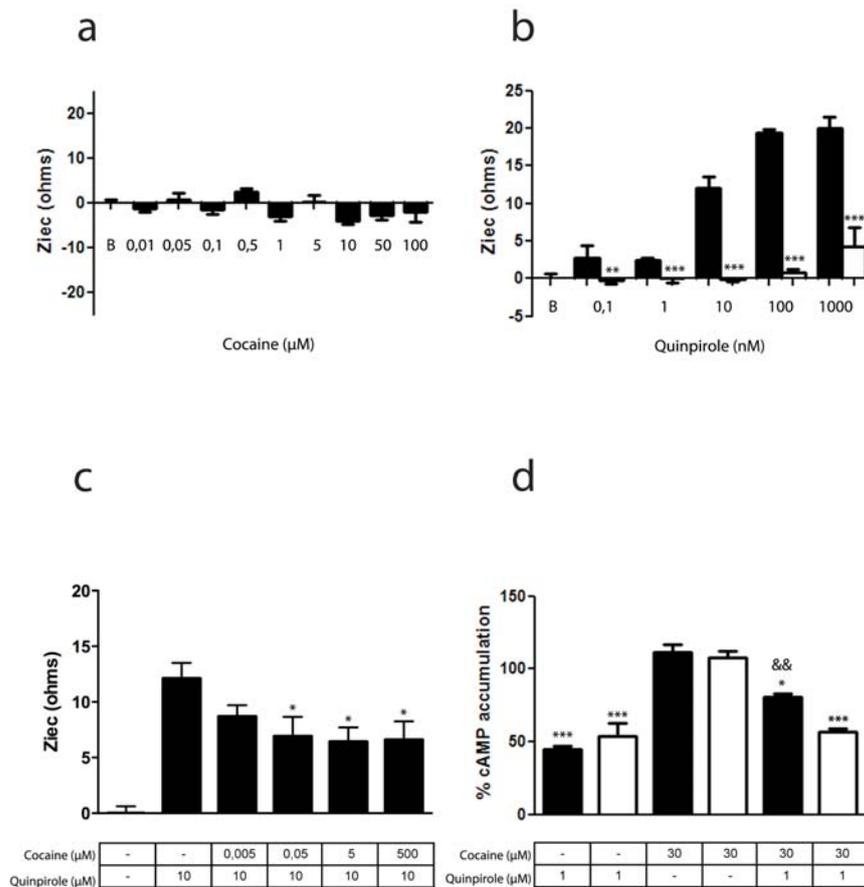


Figura 4. La unió de cocaïna al receptor σ_1 modula la senyalització per G_i del receptor D_2 en cèl·lules transfectades. S'han realitzat experiments de CellKey sense marcatge en cèl·lules CHO que expressen de manera estable els receptors D_2 . A (a) les cèl·lules s'han estimulat amb concentracions creixents de cocaïna, a (b) les cèl·lules s'han preincubats (columnes negres) o no (columnes blanques) amb PTx (10 ng/ml) durant la nit anterior i s'han estimulat amb concentracions creixents de quinpirole. A (c), les cèl·lules s'han estimulat amb quinpirole 1 μ M en absència o en presència de concentracions creixents de cocaïna. S'ha determinat la producció de cAMP en cèl·lules CHO que expressen de manera estable els receptors D_2 i transfectades (columnes negres) o no (columnes blanques) amb el siRNA (6.25 μ g) per σ_1 i estimulades amb forskolina 5 μ M en absència o en presència de quinpirole 1 μ M i cocaïna 30 μ M, sols o en combinació; s'han representat els valors respecte el tractament amb forskolina. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 4 a 8 experiments diferents. La significativitat estadística s'ha calculat per un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test de comparació múltiple de Bonferroni; a (b) ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.005$ comparats amb les cèl·lules no tractades amb PTx, a (c) * $p < 0.05$ comparat amb les cèl·lules només tractades amb quinpirole i a (d) && $p < 0.01$ comparat amb les cèl·lules tractades amb quinpirole i * $p < 0.05$ i *** $p < 0.005$ respecte a les cèl·lules tractades amb forskolina.

A part de la senyalització mitjançada per proteïna G, molts GPCR poden senyalitzar de manera independent d'aquesta (Luttrell et al., 1999; Shenoy i Lefkowitz, 2003; Beaoulieu et al., 2005; Shenoy et al., 2006; DeWire et al., 2007). La fosforilació d'ERK1/2 és una de les vies de les MAPK que s'ha descrit que s'activa en un mecanisme dependent d'arrestina i independent de proteïna G

(Shenoy et al., 2006). Diversos estudis ha destacat la importància de l'activació de ERK1/2 en neurones que expressen D₂ i que estan sota els efectes de la cocaïna (Valjent et al., 2000; Lu et al., 2006). En aquest treball s'ha estudiat com la cocaïna podia influenciar en la senyalització per ERK1/2 dels heteròmers σ_1 -D₂. En tractar les cèl·lules a diferents concentracions de cocaïna o a diferents temps no s'ha detectat cap canvi en la fosforilació de ERK1/2 en cèl·lules que no expressen el receptor D₂ (Fig. S3, als *Apèndix*). Però en canvi, la cocaïna *per se*, de manera dosi-depenent (Fig. S4a) i temps-depenent (Fig. S4b) activa la fosforilació de ERK1/2 en cèl·lules que expressen els receptors D₂. Aquest efecte ha estat mediat pels receptors σ_1 ja que, es veu clarament disminuït quan les cèl·lules es transfecten amb el siRNA dels receptors σ_1 (Fig. S4). L'agonista del receptor D₂ quinpirole també pot activar la fosforilació d'ERK1/2 de manera dosi- i temps-depenent (Fig. S4c i S4d), i tal com s'esperava, aquest efecte no es veu reduït en cèl·lules transfectades amb el siRNA dels receptors σ_1 (Fig. S4). Aquests resultats assenyalen que l'activació dels receptors σ_1 o D₂ en els heteròmers σ_1 -D₂ indueix la fosforilació de ERK1/2. Per tant, la cocaïna i el quinpirole poden actuar com a agonistes per l'heteròmer en l'activació de les MAPK.

Una propietat d'alguns heteròmers de receptors és la capacitat de l'antagonista d'un receptor per bloquejar la funció de l'agonista de l'altre receptor de l'heteròmer, una propietat que s'ha definit com a antagonisme creuat (Moreno et al., 2011).. S'ha trobat que la fosforilació d'ERK1/2 induïda per cocaïna s'ha vist contrarestada no només per l'antagonista del receptor σ_1 PD144.418 (1 μ M) sinó també per l'antagonista del receptor D₂ raclopride (10 μ M; Fig. 5a). Anàlogament, la fosforilació d'ERK1/2 induïda per l'agonista del receptor D₂ quinpirole es veu bloquejada tant per raclopride com per PD144.418 (Fig. 5b). Aquests resultats suggereixen que la unió d'un antagonista a un receptor comporta canvis estructurals en l'heteròmer que bloquegen la senyalització a través de l'altre receptor. Per definició, un antagonista no pot induir senyalització, per tant l'antagonisme creuat només pot derivar de la interacció directa proteïna-proteïna establida entre els receptors en l'heteròmer σ_1 -D₂. Aquest hipòtesi es veu recolzada per fet que el silenciament de σ_1 comporta la pèrdua de l'antagonisme creuat. És a dir, l'efecte del PD144.418 en la fosforilació de ERK1/2 induïda per quinpirole no s'observa en cèl·lules que han estat transfectades amb el siRNA per als receptors σ_1 (Fig. 5b).

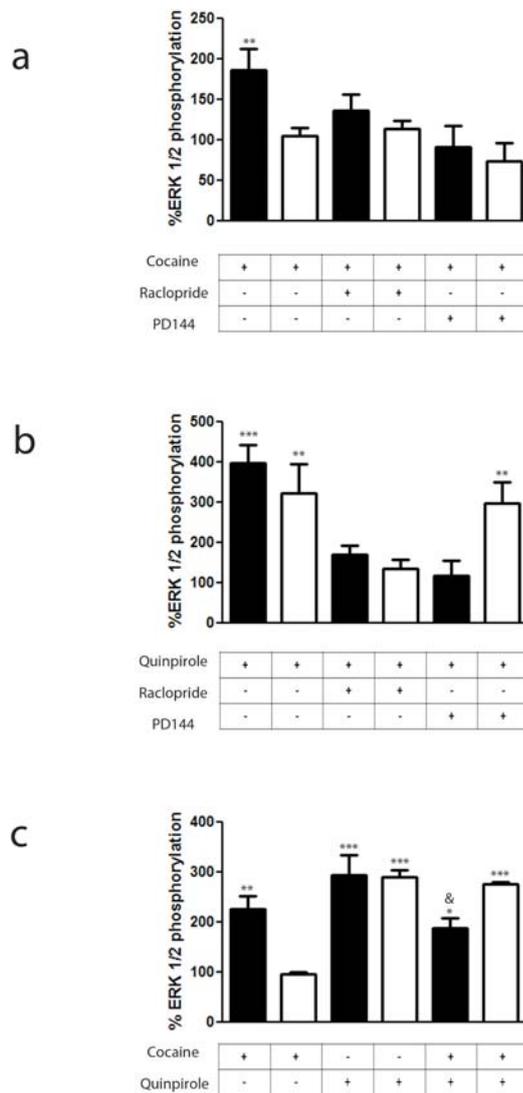


Figura 5. La unió de cocaïna al receptor σ_1 modula la senyalització per ERK 1/2 en cèl·lules transfectades. Fosforilació de ERK1/2 en cèl·lules CHO transfectades transitòriament amb el cDNA del receptor D₂ (1 μ g; barres negres) o cotransfectades amb el cDNA del receptor D₂ i el siRNA per a σ_1 (6.24 μ g) que s'han incubat durant 30 (a) o 10 (b) min amb medi (basal) o amb 30 μ M de cocaïna (a) o 1 μ M de quinpirole (b) en presència o en absència de raclopride 1 μ M o PRE084 100nM. A (c) les cèl·lules s'han tractat amb medi (basal), cocaïna 30 μ M (30 min), quinpirole 1 μ M (10 min) o amb la combinació dels dos. En tots els casos la fosforilació de ERK1/2 es presenta com un percentatge dels nivells basals de fosforilació. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 6 a 8 experiments realitzats per duplicat. Segons un anàlisi ANOVA bifactorial, respecte al basal, ** $p < 0.1$ i *** $p < 0.005$.

Tal com s'ha mencionat anteriorment, la cocaïna pot inhibir els transportadors DAT i incrementar la concentració de dopamina a l'estriat; per tant, en presència de cocaïna es podrien activar els dos receptors de l'heteròmer σ_1 -D₂. Per tant, ens hem preguntat què passaria en la fosforilació de ERK1/2 si s'activessin ambdós receptors a la vegada. Sorprenentment s'ha detectat una

interacció negativa. Quan les cèl·lules que expressen els receptors D_2 s'han tractat amb quinpirole (1 μM) i cocaïna (30 μM) hi ha una reducció en la fosforilació de ERK1/2 comparada amb les cèl·lules tractades només amb quinpirole (Fig. 5c). Aquesta diferència, en canvi, no s'ha observat en cèl·lules deplecionades de receptors σ_1 via siRNA (Fig. 5c).

4.5 Els heteròmers σ_1 - D_2 es troben a l'estriat cerebral.

Els experiments de BRET i de senyalització suggereixen que els complexos heteromèrics poden portar a canvis en la funció del receptor D_2 . De totes maneres tots aquests experiments han estat duts a terme en cèl·lules transfectades. Per establir si aquests complexos i les seves implicacions funcionals es poden observar en teixits, s'han obtingut estriats de ratolins *wild-type* (WT) i *knock-out* per σ_1 (KO). L'estriat expressa els receptors D_2 a les neurones de la via motora indirecta que és una de les àrees del cervell on la cocaïna exerceix els seus efectes. S'ha examinat si els heteròmers σ_1 - D_2 es podien detectar en aquest teixit natiu. En primer lloc es van realitzar experiments de coimmunoprecipitació. Es va detectar l'expressió d'ambdós receptors a l'estriat dels ratolins WT però només la dels receptors D_2 als ratolins KO (Fig. 6a). L'anticòs contra el receptor D_2 va precipitar tant el receptor D_2 (Fig. 6b) com el σ_1 (Fig. 6c) en ratolins WT tractats o no amb cocaïna (30 μM). Aquesta co-precipitació no es va observar en el teixit dels animals KO (Fig. 6b i 6c). Encara que aquestes dades siguin coherents amb les de BRET i suggereixin molt fortament la presència dels heteròmers σ_1 - D_2 a l'estriat, s'han realitzat experiments per demostrar que aquests resultats no són un artefacte degut a la solubilització de les membranes amb detergent. Per comprovar-ho, s'ha usat la tècnica desenvolupada recentment de lligació per proximitat (PLA) en talls d'estriat dels ratolins WT i KO per σ_1 . Tal com es mostra a la Figura 6d, quan l'assaig es realitza en talls estriatals d'animals WT tractats o no amb cocaïna (30 μM) s'observa una tinció vermella en forma puntuada, indicant que els dos receptors estan en un complex a l'estriat de ratolí. En contrast, aquesta tinció no s'observa quan els experiments es duen a terme en talls estriatals de ratolins KO (Fig. 6d). Aquests resultats són una nova evidència de l'existència dels receptors heteromèrics σ_1 - D_2 a l'estriat.

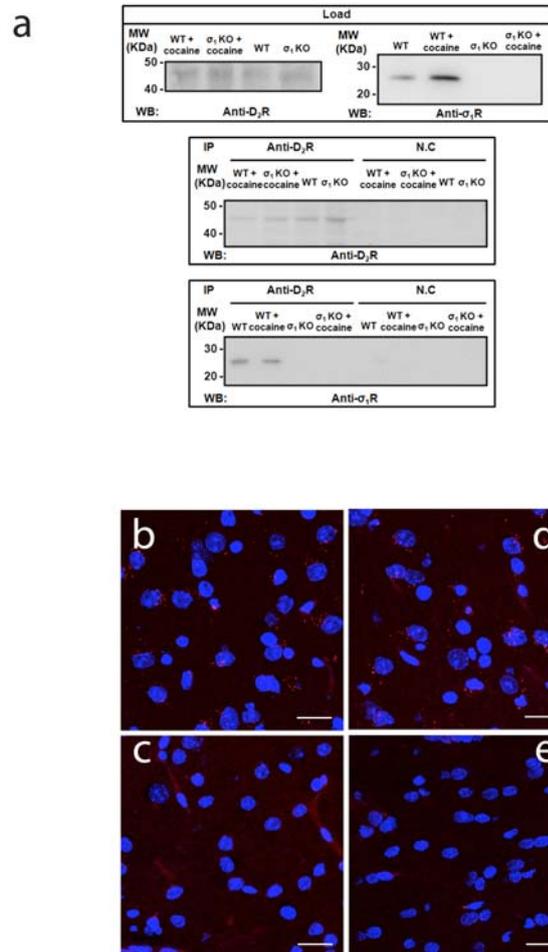


Figura 6. Expressió dels receptors heteromèrics σ_1 -D₂ a l'estriat. De (a) a (c) es mostren els experiments de coimmunoprecipitació en que les membranes estriatals de ratolins WT o KO s'han tractat o no amb cocaïna 30 μ M durant 30 min.

4.6 La unió de cocaïna als receptors σ_1 modula la senyalització dels receptors D₂ a l'estriat cerebral de ratolí.

Els resultats mostrats anteriorment proporcionen una clara evidència de la presència dels heteròmers σ_1 -D₂ *in vivo*, però no aporten informació de la funció d'aquests complexos. Per tant, s'ha volgut comprovar si la interacció negativa observada en cèl·lules transfectades també es podia observar a l'estriat. En cèl·lules transfectades l'efecte de la cocaïna es detecta de manera significativa a 15 μ M, una concentració que es podria donar a l'estriat després de consumir dosis significatives de cocaïna (Pettit et al., 1990). Per permetre la difusió als talls estriatals, s'ha usat una concentració de 150 μ M de cocaïna. Tant l'agonista del receptor D₂ quinpirole (1 μ M) com la cocaïna (150 μ M) indueixen la fosforilació d'ERK1/2 en talls estriatals de ratolí després d'una activació durant

10 o 30 min (Figs. 7a i S5, a l'Apèndix). A més, en els talls estriatals de ratolins WT la coactivació amb quinpirole i cocaïna bloqueja la fosforilació d'ERK1/2 (Figs. 7a i S5). Per tant, la interacció negativa entre σ_1 i D_2 detectada en cèl·lules transfectades també s'ha observat en mostres estriatals de ratolins WT, cosa que significa que la mateixa "empremta dactilar" observada en cèl·lules transfectades s'observa en teixit de ratolins WT. Experiments similars s'han realitzat en ratolins KO per σ_1 , en els quals la cocaïna no ha pogut induir fosforilació d'ERK1/2 (Figs. 7a i S5) i la senyalització induïda per quinpirole no es veu modificada per la cocaïna (Figs. 7a i S5). El conjunt d'aquests resultats recolza l'existència de receptors heteromèrics σ_1 - D_2 funcionals a l'estriat i indica que tots els efectes detectats per la cocaïna depenen de l'expressió dels receptors σ_1 .

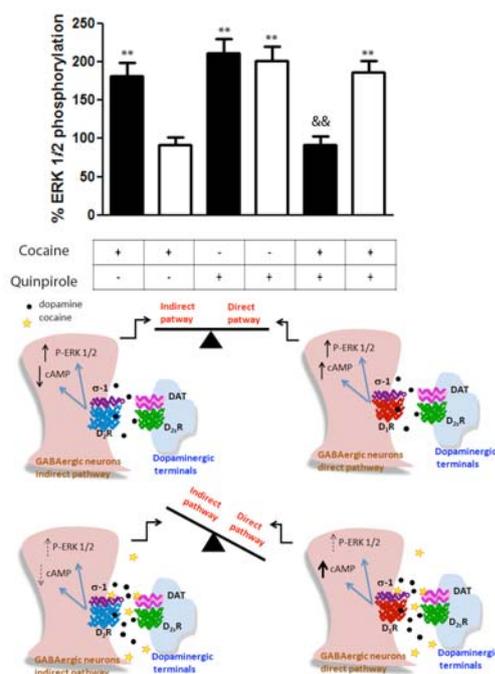


Figura 7. Cross-talk negatiu entre la cocaïna i l'agonista del receptor D_2 quinpirole a l'estriat de ratolí. (a) Els talls estriatals de ratolins WT (barres negres) o KO (barres blanques) s'han tractat amb quinpirole 1 μ M (10 min) o amb cocaïna 150 μ M (30 min) o amb la combinació dels dos. Els valors representats són la mitjana \pm SEM del percentatge de fosforilació de 5 a 6 talls d'animals diferents respecte el nivell basal en talls sense tractar. No s'han trobat diferències significatives entre els nivells basals dels ratolins WT o KO per σ_1 . Un anàlisi ANOVA bifactorial mostra diferències significatives sobre el basal (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.005). Un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test de Bonferroni mostra significativu en l'efecte de la cocaïna sobre el quinpirole (&#amp;#gt; p >0.05; &#amp;#lt; p <0.01). A (b) es mostra un esquema representatiu del conjunt de resultats exposat en aquest treball: les imatges superiors mostren la senyalització dels receptors D_1 i D_2 de dopamina en les vies directa i indirecta després de la unió de cocaïna. Les imatges inferiors representen l'efecte de la cocaïna incrementant la cocentració de dopamina (inhibint els DAT) i interaccionant amb els receptors σ_1 dels receptors heteromèrics σ_1 - D_2 i σ_1 - D_1 alterant la senyalització dels receptors de dopamina.

4.7 Discussió

Els resultats presentats en aquest capítol duen a diverses conclusions sobre el paper dels receptors D_2 en els episodis inicials que segueixen a l'exposició a cocaïna. En primer lloc, els receptors D_2 de dopamina poden heteromeritzar amb els receptors σ_1 , un tret que és específic dels receptors D_2 , ja que els altres membres de la família D_2 -like, D_3 i D_4 , no formen heteròmers amb σ_1 . En segon lloc, els heteròmers σ_1 - D_2 consisteixen en oligòmers d'ordre superior en què la unitat estructural mínima són els tetràmers σ_1 - σ_1 - D_2 - D_2 . En tercer lloc, els heteròmers de receptors σ_1 - D_2 es troben a l'estriat de ratolí i hi són funcionals. I finalment, la unió de cocaïna als heteròmers σ_1 - D_2 inhibeix la senyalització induïda pels agonistes del receptor D_2 tant en cèl·lules en cultiu com en estriat de ratolí.

El consum de cocaïna eleva els nivells de dopamina a l'estriat, particularment a la seva part més ventral, el nucli accumbens (NAc), que s'ha vist que és un substrat anatòmicament preferent per als mecanismes de recompensa (Koob et al., 2006; DiChiara Bassareo, 2007). La cocaïna explota el sistema dopaminèrgic per dur a terme part dels seus efectes cel·lulars i comportamentals (De Mei et al., 2009). Estudis previs havien suggerit que el transportador DAT era la diana primària per als efectes de la cocaïna (Ritz et al., 1997; Giros et al., 1996; Chen et al., 2006; Ferragud et al., 2009). Però de totes maneres, no tots els efectes de la cocaïna poden ser mediat per un augment de la concentració de dopamina derivada d'aquesta inhibició de DAT. De fet, la cocaïna pot interaccionar amb diverses proteïnes, entre les quals s'ha descrit que pot fer-ho amb els receptors σ_1 a concentracions assumibles fisiològicament (Matsumoto et al., 2003; Cobos et al., 2008). A més, el fet de reduir els nivells de σ_1 al cervell mitjançant oligonucleòtids antisentit atenua les accions convulsives i d'estimulació del sistema motor de la cocaïna (Matsumoto et al., 2001, 2002) i també els antagonistes dels receptors σ_1 mitiguen les accions de la cocaïna en models animals (Matsumoto et al., 2003). Els receptors σ_1 es troben altament expressats al cervell (Hayashi i Su, 2005, Alonso et al., 2000) i al caudat-putamen i el nucli accumbens (les parts dorsals i ventrals de l'estriat, respectivament; que són les regions que medien els efectes a llarg termini de la cocaïna) s'ha demostrat que l'administració repetida de cocaïna induïx un increment en l'expressió dels receptors σ_1 , un procés que es veu mediat pels receptors D_1 de dopamina (Zhang et al., 2005). És més, el nostre grup ha demostrat la importància de la interacció entre D_1 i σ_1 en els episodis inicials que segueixen a l'exposició a cocaïna (Navarro et al., 2010). A través dels

heteròmers σ_1 -D₁ la cocaïna potencia robustament els efectes de l'activació de l'adenilat ciclasa mediada per D₁, proporcionant un mecanisme molecular per explicar els efectes de la cocaïna a través de D₁ (Navarro et al., 2010). En aquest capítol ens hem centrat en el paper del receptor D₂, en addició a DAT i D₁, com un efector addicional dels efectes aguts de la cocaïna i hem vist que aquest rol està, també, sota el control dels receptors σ_1 . S'ha trobat que els receptors σ_1 i D₂ interaccionen tant a nivell molecular com funcional. A nivell molecular, usant les tècniques de transferència d'energia per ressonància, s'ha demostrat l'oligomerització dels receptors σ_1 en cultius cel·lulars i que els receptors σ_1 i D₂ formen heteròmers preconstituïts, com a mínim, per un homodímer de σ_1 i un homodímer de D₂. La unió de cocaïna al receptor σ_1 de l'heteròmer promou canvis estructurals en aquest que comporten modificacions significatives de la funció del receptor D₂. La cocaïna per si mateixa no pot induir una senyalització mitjançada per proteïna G, però actuant a través de l'heteròmer σ_1 -D₂ pot fer disminuir la capacitat dels receptors D₂ per senyalitzar a través de la proteïna G_i. Per tant, la inhibició que provoca el receptor D₂ sobre la producció d'AMPC es veu significativament reduïda per la unió de cocaïna al heteròmer σ_1 -D₂, resultant en una inhibició de la senyalització de D₂ per part de la cocaïna. A més, la cocaïna *per se* activa la fosforilació de ERK1/2 en un procés que requereix tant els receptors σ_1 com D₂. Aquests resultats indiquen que la cocaïna actua com un agonista dels heteròmers σ_1 -D₂ a nivell d'activació de les MAPK. De manera destacable, els experiments de coimmunoprecipitació han suggerit que l'heteròmer σ_1 -D₂ es troba present a l'estriat, i se n'han obtingut evidències directes mitjançant els experiments de PLA que han donat resultats positius en ratolins WT i no en els KO per σ_1 . La inducció que fa la cocaïna de la fosforilació d'ERK1/2 també s'ha demostrat en talls estriatals de ratolí, i no en els talls estriatals dels animals KO. A més, a l'estriat de ratolins WT la cocaïna inhibeix la fosforilació de ERK1/2 mediada pels receptors D₂. En resum, la unió de cocaïna als heteròmers σ_1 -D₂ fa disminuir la senyalització del receptor D₂.

L'efecte de la cocaïna en la senyalització dels heteròmers σ_1 -D₂ es contraposa amb l'efecte de la cocaïna en la senyalització dels heteròmers σ_1 -D₁ descrit per Navarro et al. (Navarro et al., 2010). En aquest últim cas, la unió de cocaïna als heteròmers σ_1 -D₁ provocava un increment significatiu en l'activació de la producció d'AMPC generada pel receptor D₁. Els resultats descrits en aquest capítol, conjuntament amb els descrits per Navarro et al., (2010), apunten a l'escenari mostrat a la Figura 7b, en que la cocaïna selectivament incrementa la senyalització a través d'AMPC en les neurones que tenen el receptor D₁ i, alhora,

redueix la inhibició de la formació de cAMP en les neurones amb D₂. Simultàniament, la cocaïna alterna els nivells de senyalització per ERK1/2 induïda tant per D₁ com per D₂ en ambdós tipus neuronals. Aquestes troballes apunten a que la cocaïna porta a una desregulació del balanç entre la senyalització de D₁ i D₂ que pot comportar conseqüències a llarg termini (Fig. 7b). Les dades presentades en aquest capítol recolzen un paper clau per als receptors σ_1 en la determinació dels efectes aguts de la cocaïna, incrementant la producció de cAMP via D₁ i disminuint la senyalització via D₂ i per tant decantant el balanç d'inputs cap a les neurones de la via directa que tenen D₁. Aquests resultats estan recolzats pels descrits per Bateup et al., (2010) en què trobaven que la resposta locomotora aguda a la cocaïna es veia reduïda després de la deleció selectiva de DARPP-32 a les neurones estriatonigrals, indicant un paper essencial de la via directa mentre que les neurones estriatopalidals que expressen D₂ s'oposaven a l'activació motora induïda per la cocaïna. Més recentment, Luo et al (2011), han trobat proves *in vivo* de l'existència d'efectes cel·lulars mediat per D₁ i D₂ (el receptor D₁ augmentava els nivells de Ca²⁺ intracel·lular mentre que el D₂ els disminuïa) amb dinàmiques significativament més lentes en els efectes mediat pel receptor D₂. Agafant en consideració els resultats presentats aquí, les observacions de Luo et al. podrien estar relacionades amb el fre en la senyalització imposat per la cocaïna sobre els heteròmers σ_1 -D₂. Per tant, la unió de cocaïna als receptors σ_1 pot influenciar significativament en la senyalització dopaminèrgica. Finalment, Ferraro et al. han observat que la cocaïna per si sola no té efecte en els nivells estriatals de glutamat però que quan aquesta s'injecta juntament amb un lligand de D₂ sí (Ferraro et al., 2012). En resum, els resultats descrits en aquest capítol proporcionen la perspectiva d'un nou mecanisme en que la cocaïna afecta de manera diferencial les vies dopaminèrgiques directa i indirecta.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 4

- [1] Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M, et al. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 2000;97:155-70.
- [2] Armstrong D, Strange PG. Dopamine D2 receptor dimer formation: evidence from ligand binding. *J Biol Chem* 2001;276:22621-9.
- [3] Asensio S, Romero MJ, Romero FJ, Wong C, Alia-Klein N, Tomasi D, et al. Striatal dopamine D2 receptor availability predicts the thalamic and medial prefrontal responses to reward in cocaine abusers three years later. *Synapse* 2010;64:397-402.

- [4] Bateup HS, Santini E, Shen W, Birnbaum S, Valjent E, Surmeier DJ, et al. Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:14845-50.
- [5] Beaulieu JM, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 2005;122:261-73.
- [6] Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamalas M, Herve D, Valjent E, et al. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 2008;28:5671-85.
- [7] Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, et al. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* 2008;11:780-9.
- [8] Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 2008;5:727-33.
- [9] Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou FM, Ching S, et al. Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9333-8.
- [10] Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendan CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol* 2008;6:344-66.
- [11] De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:53-8.
- [12] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2007;69:483-510.
- [13] Di Chiara G, Bassareo V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:69-76.
- [14] Ferragud A, Velazquez-Sanchez C, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, Merino V, Carda M, et al. A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;207:281-9.
- [15] Ferraro L, Frankowska M, Marcellino D, Zaniewska M, Beggiano S, Filip M, et al. A Novel Mechanism of Cocaine to Enhance Dopamine D(2)-Like Receptor Mediated Neurochemical and Behavioral Effects. An In Vivo and In Vitro Study. *Neuropsychopharmacology* 2012.
- [16] Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996;379:606-12.
- [17] Guo W, Shi L, Javitch JA. The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J Biol Chem* 2003;278:4385-8.
- [18] Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J* 2008;27:2293-304.
- [19] Hayashi T, Su T. The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol* 2005;3:267-80.
- [20] Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403-13.
- [21] Koob GF. The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 2006;101 Suppl 1:23-30.
- [22] Krawczyk M, Sharma R, Mason X, Debacker J, Jones AA, Dumont EC. A switch in the neuromodulatory effects of dopamine in the oval bed nucleus of the stria terminalis associated with cocaine self-administration in rats. *J Neurosci* 2011;31:8928-35.
- [23] Lee SP, O'Dowd BF, Ng GY, Varghese G, Akil H, Mansour A, et al. Inhibition of cell surface expression by mutant receptors demonstrates that D2 dopamine receptors exist as oligomers in the cell. *Mol Pharmacol* 2000;58:120-8.
- [24] Lu L, Koya E, Zhai H, Hope BT, Shaham Y. Role of ERK in cocaine addiction. *Trends Neurosci* 2006;29:695-703.
- [25] Luo Z, Volkow ND, Heintz N, Pan Y, Du C. Acute cocaine induces fast activation of D1 receptor and progressive deactivation of D2 receptor striatal neurons: in vivo optical

- microprobe [Ca²⁺]_i imaging. *J Neurosci* 2011;31:13180-90.
- [26] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;283:655-61.
- [27] Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ. Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* 2003;469:1-12.
- [28] Matsumoto RR, McCracken KA, Friedman MJ, Pouw B, De Costa BR, Bowen WD. Conformationally restricted analogs of BD1008 and an antisense oligodeoxynucleotide targeting sigma1 receptors produce anti-cocaine effects in mice. *Eur J Pharmacol* 2001;419:163-74.
- [29] Matsumoto RR, McCracken KA, Pouw B, Zhang Y, Bowen WD. Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* 2002;42:1043-55.
- [30] Maurice T, Su TP. The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther* 2009;124:195-206.
- [31] Moreno E, Vaz SH, Cai NS, Ferrada C, Quiroz C, Barodia SK, et al. Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. *J Neurosci* 2011;31:7412-23.
- [32] Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol J, et al. Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18676-81.
- [33] Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, et al. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:200-4.
- [34] Pettit HO, Pan HT, Parsons LH, Justice JB, Jr. Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. *J Neurochem* 1990;55:798-804.
- [35] Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 1987;237:1219-23.
- [36] Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza PV, Borrelli E. Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors. *J Neurosci* 2002;22:3293-301.
- [37] Sharkey J, Glen KA, Wolfe S, Kuhar MJ. Cocaine binding at sigma receptors. *Eur J Pharmacol* 1988;149:171-4.
- [38] Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2006;281:1261-73.
- [39] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 2003;375:503-15.
- [40] Thompson D, Martini L, Whistler JL. Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS One* 2010;5:e11038.
- [41] Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 2000;20:8701-9.
- [42] Welter M, Vallone D, Samad TA, Meziane H, Usiello A, Borrelli E. Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6840-5.
- [43] Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ, et al. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 1994;79:945-55.
- [44] Zhang D, Zhang L, Tang Y, Zhang Q, Lou D, Sharp FR, et al. Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1443-54.

CAPÍTOL 5

Interaccions al·lostèriques entre receptors a l'heteròmer A_{2A}-D₂ induïdes per agonistes i antagonistes

Els receptors D₂ de dopamina s'expressen a les neurones estriatals GABAèrgiques encefalinèrgiques on també s'expressen els receptors A_{2A} d'adenosina i on ambdós col·localitzen (Gerfen et al., 2004; Rosin et al., 1998; Schiffmann et al., 2007). De fet, els receptors D₂ estan sota el control dels receptors A_{2A} i, almenys en part, aquest control s'exerceix a través d'un fet altament descrit en els darrers anys que és la modulació de la funció a través de la formació d'heteròmers de receptors (Ferré et al., 2007; Terrillon i Bouvier, 2004; Bulenger et al., 2005; Waldhoer et al., 2005; Smith i Milligan, 2010). Un heteròmer és un complex macromolecular format almenys per dos receptors funcionals i que mostra propietats bioquímiques que són diferents de les dels receptors individuals (Ferré et al., 2009). Els heteròmers entre els receptors A_{2A} d'adenosina i D₂ de dopamina van ser uns dels primers heteròmers de GPCR descrits (Hillion et al., 2002). La interacció molecular entre ambdós receptors es va demostrar mitjançant estudis de coimmunoprecipitació i col·localització, i per tècniques de FRET i BRET (Canals et al., 2003; Kamiya et al., 2003; Ciruela et al., 2004). L'existència dels heteròmers A_{2A}-D₂ a l'estriat de xai ha estat recentment descoberta emprant lligands bivalents (Soriano et al., 2009) i l'expressió d'aquests heteròmers a l'estriat de ratolí s'ha descrit en estudis de PLA (*Proximity Ligation Assays*; Trifilieff et al., 2011). Els heteròmers de receptors A_{2A}-D₂ són molt rellevants per al control de l'activitat motora ja que estan presents en la via indirecta estriatal i el balanç en l'estimulació de les vies directa i indirecta resulta en el control del moviment (Obeso et al., 2002; DeLong i Witchmann, 2007).

La interacció al·lostèrica és una de les propietats habituals dels heteròmers de receptors i es defineix com una interacció intramolecular per la qual la unió d'un lligand a un receptor de l'heteròmer canvia les propietats d'unió de lligands a l'altre receptor de l'heteròmer (Ferré et al., 2009). Les interaccions al·lostèriques en l'heteròmer A_{2A}-D₂ han rebut molta atenció de la comunitat científica però aquesta s'ha restringit a les interaccions al·lostèriques agonista-agonista. Aquestes s'han considerat com el principal responsable dels efectes antiparkinsonians dels antagonistes del receptor A_{2A} (Ferré et al., 2004, 2008; Muller i Ferré, 2007) i sembla que mitjançant heteròmers els agonistes dels receptors A_{2A} contraresten la inhibició produïda pels agonistes del receptor D₂ de la estimulació mitjançada per receptors NMDA en neurones estriatals de la via indirecta (Azdad et al., 2009; Giggley i Sabatini, 2010). La interacció al·lostèrica també s'ha suggerit com el principal mecanisme responsable dels efectes de depressió o activació motora que causen els agonistes o antagonistes del receptor A_{2A}, respectivament (Ferré et al., 2008). En tots aquests casos, els antagonistes del receptor A_{2A} juguen només un paper com a desplaçant de l'agonista endògen. De totes maneres, mai ha estat considerat el possible efecte exercit directament pels antagonistes del receptor A_{2A} en la modulació de les propietats farmacològiques dels receptors D₂. En aquest capítol s'ha demostrat que, mitjançant interaccions al·lostèriques no només l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 sinó també l'antagonista no-selectiu cafeïna redueixen la unió tant de l'agonista ([³H]quinpirole) com de l'antagonista ([³H]raclopride) del receptor D₂ en membranes tant de cèl·lules transfectades com d'estriat de xai. Emprant aquestes interaccions al·lostèriques com a empremta dactilar de l'heteròmer A_{2A}-D₂, hem demostrat l'expressió del heteròmer a l'estriat humà.

Els resultats d'aquest capítol formen part del treball **Agonist- and antagonist-induced allosteric interactions in the A_{2A}-D₂ receptor heteromers in human brain caudate nucleus** per Bonaventura J, Brugarolas M, Navarro G, Mallol J, Canela EI, Meana J, Franco R, Volkow ND, Lluís C, McCormick PJ, Cortés A, Ferré S I Casadó V. que està enviat a *Biochemical Journal* per la seva publicació.

5.1 Els agonistes i antagonistes del receptor A_{2A} d'adenosina modulen al·lostèricament l'afinitat d'agonistes i antagonistes pel receptor D_2 de dopamina a través de l'heteròmer A_{2A} - D_2 .

Per evaluar el paper modulador dels agonistes i antagonistes del receptor A_{2A} d'adenosina sobre la unió d'agonistes i antagonistes al receptor D_2 de dopamina s'han usat cèl·lules CHO que expressen els heteròmers de receptors A_{2A} - D_2 . En primer lloc, tal com s'havia demostrat prèviament en cèl·lules HEK-293T (Canals et al., 2003), es va investigar la capacitat de formar heteròmers entre els receptors A_{2A} i D_2 en les cèl·lules CHO transfectades de manera transitòria amb les proteïnes de fusió A_{2A} -RLuc i D_2 -YFP. Per obtenir les proteïnes de fusió, els cDNA dels receptors A_{2A} i D_2 s'han amplificat i s'han clonat en els vectors pcDNA3.1-RLuc (Clontech, Heidelberg, Alemanya) per a A_{2A} , i pEYFP-N1 (Clontech, Heidelberg, Alemanya) per a D_2 . Les proteïnes de fusió s'expressaven a la membrana, no estaven altament sobreexpressades i quantitativament la seva expressió era similar (Carriba et al., 2008). Emprant aquests receptors, s'ha obtingut un senyal positiu de BRET per a la transferència d'energia (Fig. 1), que ha augmentat hiperbòlicament en funció de la concentració de D_2 -YFP. Com a control negatiu s'ha usat la parella formada pels receptors A_{2A} -RLuc i $5HT_{2B}$ -YFP, el cDNA per la proteïna de fusió $5HT_{2B}$ -YFP ha estat proporcionat per la Dra. Irma Nardi (Universitat de Pisa, Italia). Tal com es mostra a la Fig. 1, el control negatiu dóna un senyal de BRET lineal i inespecífic. Per contra, el fet que la corba de BRET sigui hiperbòlica per a la parella de receptors A_{2A} - D_2 és específic.

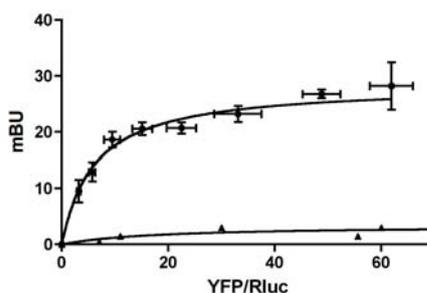


Figura 1. Identificació dels heteròmers A_{2A} - D_2 en cèl·lules CHO transfectades. S'han realitzat experiments de saturació de BRET amb cèl·lules CHO cotransfectades amb quantitats creixents del cDNA corresponent a D_2 -YFP (de 0,2 a 5 μ g) i 0,5 μ g de cDNA corresponent a A_{2A} -RLuc (cercles). La fluorescència i luminiscència de cada mostra s'han mesurat abans de cada experiment per confirmar expressions similars del donador (100 000 unitats luminiscentes) mentre es monitoritzava l'augment d'expressió de l'acceptor (10 000 - 25 000 unitats fluorescents). Com a control negatiu, s'ha obtingut un BRET lineal en cèl·lules que expressaven unitats equivalents de luminiscència i fluorescència corresponent a A_{2A} -RLuc (0,5 μ g de cDNA) i del receptor de serotonina $5HT_{2B}$ -YFP (de 0,5 a 8 μ g de cDNA) (triangles). Les dades s'expressen com a mitjana \pm SD de 4-6 experiments diferents agrupats en funció de la quantitat d'acceptor de BRET (veure *Materials i mètodes*).

Una vegada demostrat que quan es transfecten els receptors en les cèl·lules CHO poden formar heteròmers, es van investigar les característiques d'unió de lligands a aquests heteròmers. Les cèl·lules CHO sembrades en plaques de 150 cm² es van transfectar amb els cDNA dels receptors humans D₂ (2 µg de cDNA/placa) i A₂ (3 µg de cDNA/placa) clonats en el vector *pcDNA3*, junts o per separat i 48 hores després de la transfecció es van aïllar les membranes cel·lulars tal com es descriu a Mètodes. Les suspensions de membranes (0,5 mg de proteïna/ml) s'han incubat durant 2 hores a 25 °C amb l'antagonista del receptor D₂ de dopamina marcat radioactivament [³H]raclopride (4 nM, GE Healthcare, Regne Unit) en presència o en absència de concentracions creixents de l'agonista del receptor A_{2A} d'adenosina CGS2680 o l'antagonista no selectiu dels receptors d'adenosina cafeïna (Sigma) tal com es descriu a Mètodes. Tant el CGS 21680 (Fig. 2a) com la cafeïna (Fig. 2b) disminueixen significativament la unió de [³H]raclopride en les cèl·lules CHO que expressaven l'heteròmer A_{2A}-D₂. Per contra, ni el CGS 21680 (Fig. 2c) ni la cafeïna (Figura 2d) han pogut modular la unió de [³H]raclopride en les membranes de les cèl·lules que només expressaven els receptors D₂ de dopamina. En aquestes membranes, només la concentració més alta de cafeïna (10 mM) ha pogut reduir lleugerament però de manera significativa la unió de [³H]raclopride, però aquest efecte no pot ser atribuït a la unió de cafeïna al receptor A_{2A} (veure més avall la constants d'afinitat del receptor A_{2A} per la cafeïna). Aquests resultats indiquen que la unió d'agonistes i antagonistes al receptor A_{2A} modulen negativament la unió dels antagonistes al receptor D₂.

De manera similar es va investigar com els lligands del receptor A_{2A} modulaven la unió d'agonistes al receptor D₂ de dopamina. La unió de l'agonista [³H]quinpirole (NEN, Perkin Elmer, Wellesley, EUA) a les membranes de cèl·lules que expressen els heteròmers de receptors A_{2A}-D₂ s'ha reduït significativament en presència de concentracions creixents de CGS 21680 (Fig. 2e) o de cafeïna (Fig. 2f), un efecte que no s'ha vist en membranes de les cèl·lules que només expressaven els receptors D₂ de dopamina (resultats no mostrats). És interessant destacar que tant el CGS 21680 com la cafeïna han estat més potents en desplaçar la unió de l'agonista de receptor D₂ ([³H]quinpirole) que de l'antagonista ([³H]raclopride). Aquests resultats indiquen que la unió de qualsevol lligand (agonista o antagonista) al receptor A_{2A} pot disminuir la unió de qualsevol lligand (agonista o antagonista) al receptor D₂ de dopamina.

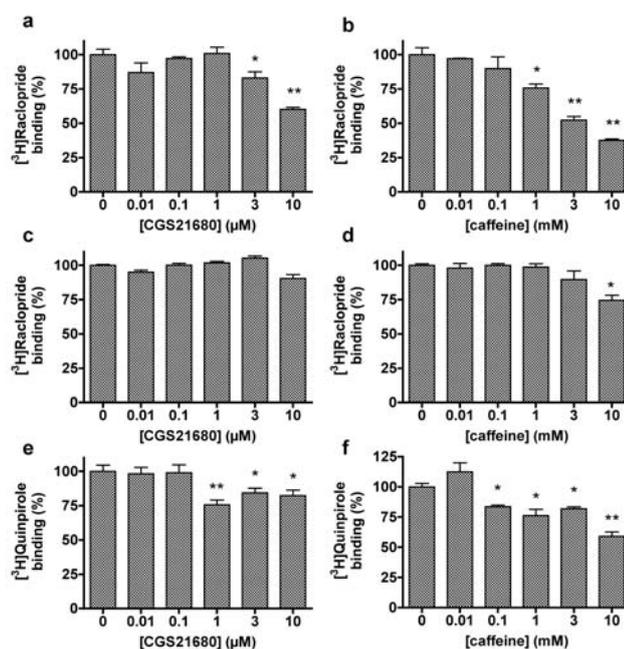


Figura 2. Efecte dels lligands del receptor A_{2A} sobre la unió de raclopride i quinpirole al receptor D_2 en cèl·lules que expressen els receptors D_2 o $A_{2A}-D_2$. Les cèl·lules CHO s'han transfectat amb els cDNA corresponents a D_2 (c i d) o els corresponents a A_{2A} i D_2 (a, b, e i f) (veure *text*). S'ha determinat la unió de [3 H]raclopride (a, b, c i d) o [3 H]quinpirole (e i f) en presència o en absència de les concentracions indicades de CGS 21680 (a, c i e) o cafeïna (b, d, i f) (veure *Materials i mètodes*). La unió específica està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands del receptor A_{2A} . Les dades són els valors \pm SEM dels triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de les mostres sense lligands d' A_{2A} s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$).

Per comprovar si aquestes interaccions al·lostèriques entre ambdós receptors són una conseqüència de les interaccions moleculars entre els dos receptors a l'heteròmer $A_{2A}-D_2$, hem analitzat si poden ser modificades per alteracions de l'estructura quaternària dels heteròmers. Recentment, s'ha mostrat que una interacció electrostàtica entre els dominis intracel·lulars de les dues unitats de receptor és essencial per al correcte ensamblament de l'estructura quaternària de l'heteròmer $A_{2A}-D_2$ (Navarro et al., 2010). Aquesta interacció electrostàtica involucra un domini ric en arginina al tercer ICL del receptor D_2 i una serina fosforil·lada (Ser374) a la cua C-terminal del receptor A_{2A} . Es disposa de mutants en els que aquesta serina, s'ha substituït per alanina per mutagènesi dirigida per obtenir el receptor A_{2A}^{A374} i es coneix que això porta a una disminució significativa en els valors de BRET (Navarro et al., 2010). Per tant, emprant aquest mutant s'ha testat la possibilitat de que

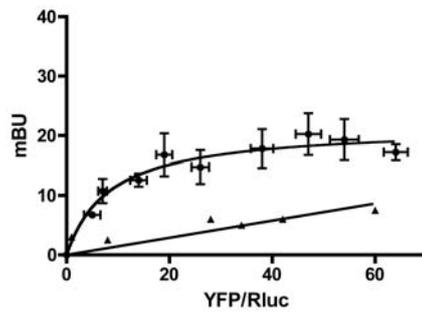


Figura 3. Identificació dels heteròmers A_{2A}^{A374} -D₂ en cèl·lules CHO transfectades. S'han realitzat experiments de saturació de BRET amb cèl·lules CHO cotransfectades amb quantitats creixents del cDNA corresponent a D₂-YFP (de 0,2 a 5 µg) i 0,5 µg de cDNA corresponent a A_{2A}^{A374} -RLuc (cercles). La fluorescència i luminiscència de cada mostra s'han mesurat abans de cada experiment per confirmar expressions similars del donador (100 000 unitats luminiscentes) mentre es monitoritzava l'augment d'expressió de l'acceptor (10 000 - 25 000 unitats fluorescents). Com a control negatiu, s'ha obtingut in BRET lineal en cèl·lules que expressaven unitats equivalents de luminiscència i fluorescència corresponent a A_{2A}^{A374} -RLuc (0,5 µg de cDNA) i del receptor de serotonina 5HT_{2B}-YFP (de 0,5 a 8 µg de cDNA) (triangles). Les dades s'expressen com a mitjana ± SD de 4-6 experiments diferents agrupats en funció de la quantitat d'acceptor de BRET (veure *Materials i mètodes*).

els receptors A_{2A}^{A374} -RLuc puguin heteromeritzar amb els receptors D₂-YFP en les cèl·lules CHO. Tal com s'esperava, l'energia transferida per BRET entre RLuc i YFP ha estat menor (Fig. 3) si es compara amb els valors de BRET obtinguts amb els receptors no mutats (Fig. 1), indicant un canvi en l'estructura quaternària que incrementa la distància entre RLuc i YFP, que estan situats a la part C-terminal dels receptors. Usant membranes de cèl·lules CHO que expressaven l'heteròmer estructuralment diferent A_{2A}^{A374} -D₂, s'ha analitzat l'efecte de la unió dels lligands al receptor A_{2A}^{A374} sobre la unió dels agonistes i antagonistes al receptor D₂. Els experiment d'unió de radiolligand s'han realitzat tal com s'ha descrit anteriorment incubant les membranes cel·lulars amb l'antagonista del receptor D₂ [³H]raclopride (4 nM; Fig 4a i 4b) o l'agonista [³H]quinpirole (10 nM, Fig 4c i 4d) i concentracions creixents de l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 (Fig. 4a i 4c) o de l'antagonista no selectiu cafeïna (Fig. 4b i 4d). Comparades amb les cèl·lules transfectades amb el receptor A_{2A} *wild-type* (Fig. 2) s'observa una potència significativament més baixa en la capacitat de CGS 21680 i de la cafeïna de disminuir la unió de [³H]raclopride i [³H]quinpirole. Aquests resultats suggereixen que l'efecte dels lligands són una conseqüència de les interaccions al·lostèriques entre ambdós receptors a l'heteròmer A_{2A} -D₂ i en constitueixen una de les seves propietats bioquímiques.

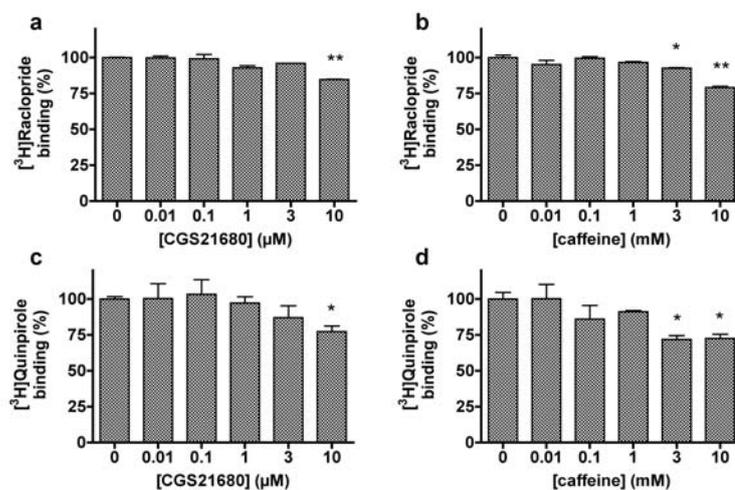


Figura 4. Efecte de la mutació puntual d'una serina al domini C-terminal del receptor A_{2A} sobre la modulació de l'afinitat del receptor D_2 pels seus lligands induïda per antagonistes i antagonistes del receptor A_{2A} . Les cèl·lules CHO s'han transfectat amb els cDNA corresponents a A_{2A}^{A374} i D_2 . S'ha determinat la unió a les membranes cel·lulars de $[^3H]$ raclopride (a i b) o $[^3H]$ quinpirole (c i d) en presència o en absència de les concentracions indicades de CGS 21680 (a i c) o cafeïna (b i d) (veure *Materials i mètodes*). La unió específica als receptors està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands del receptor A_{2A} . Les dades són els valors \pm SEM dels triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de lligands d' A_{2A} s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$).

5.2 Interaccions al·lostèriques en l'heteròmer A_{2A} - D_2 en teixit natiu.

Per evaluar l'efecte de la unió dels lligands del receptor A_{2A} sobre la unió dels lligands del receptor D_2 en un teixit natiu, s'han realitzat experiments d'unió de radiolligands usant membranes d'estriat cerebral de xai (veure *Materials i mètodes*) on ambdós receptors estan altament coexpressats i on formen heteròmers (Soriano et al., 2009). Primer s'ha analitzat l'efecte de la unió de lligands del receptor A_{2A} sobre la unió de l'antagonista del receptor D_2 $[^3H]$ raclopride (2 nM). Tal com es mostra a la Figura 5, tant el CGS 21680 com la cafeïna (Fig 5a i 5c) disminueixen significativament la unió de $[^3H]$ raclopride als receptors D_2 amb la mateixa potència que s'observava en les cèl·lules cotransfectades. Per determinar si l'afinitat del agonista i antagonista del receptor A_{2A} es pot correlacionar amb la concentració de lligand capaç de disminuir significativament la unió de $[^3H]$ raclopride als receptors D_2 , s'han determinat les constants d'afinitat del CGS 21680 i la cafeïna en les mateixes condicions experimentals. Per això, s'han fet experiments de competició amb l'antagonista del receptor A_{2A} marcat radioactivament $[^3H]$ ZM 241385 a una concentració constant de 2 nM i concentracions creixents (triplicats de 13

concentracions diferents) de CGS21680 o cafeïna (veure *Materials i mètodes*). Tal com es mostra a la Fig. 5d, la corba de competició amb l'antagonista és monofàsica ($D_C = 0$, veure *Materials i mètodes* o *Capítol 2*) d'acord amb el comportament no cooperatiu descrit per als antagonistes del receptor A_{2A} , mentre que la corba de competició per a l'agonista CGS 21680 és bifàsica (Fig 5b) d'acord amb una modulació antagonista/agonista ($K_{DAB} = 32 \pm 8$ nM; $D_C = 0$, veure *Materials i mètodes* o *Capítol 2*; Casadó et al., 2009). Les dades d'unió s'han ajustat a l'equació 5 (veure *Materials i mètodes*). La constant de l'equilibri de dissociació (K_{DB1}) de CGS 21680 o cafeïna als receptors A_{2A} ha estat de 45 ± 5 nM o 25 ± 2 μ M, respectivament (mitjana \pm SEM de tres experiments diferents). Per tant, en aquestes condicions experimentals, l'afinitat dels agonistes i els antagonistes per al receptor A_{2A} es correlaciona amb la concentració capaç de disminuir significativament la unió de [3 H]raclopride als receptors D_2 .

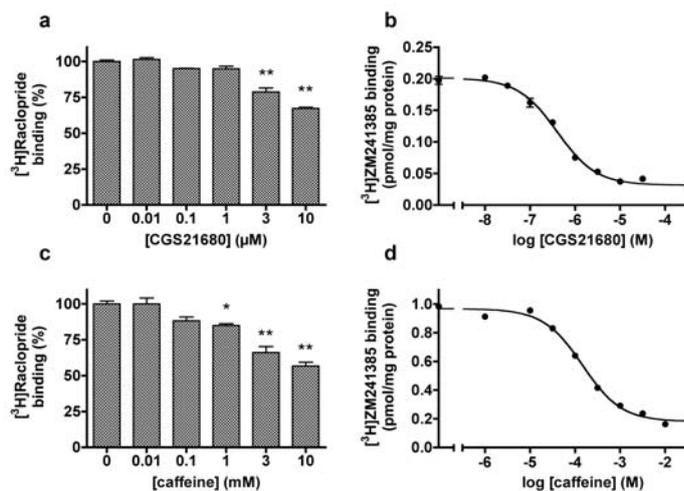


Figura 5. Modulació per lligands del receptor A_{2A} de la unió de [3 H]raclopride a membranes estriatals de xai. S'ha determinat la unió de [3 H]raclopride en presència o en absència de les concentracions indicades de CGS 21680 (a) o cafeïna (c) a membranes estriatals de xai (veure *Materials i mètodes*). La unió específica està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands del receptor A_{2A} . A (b) i (d) es representen els experiments de competició de [3 H]ZM 241385 versus CGS 21680 o cafeïna en les mateixes condicions experimentals. Les dades són els valors \pm SEM dels triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de les mostres sense lligands d' A_{2A} s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$).

La disminució de la unió de [3 H]raclopride que provoquen els lligands del receptor A_{2A} és consistent amb un increment de la constant d'afinitat del [3 H]raclopride per a la unió als receptors D_2 de dopamina. De fet, en els experiments de competició de la unió de [3 H]raclopride (4 nM) versus concentracions creixents de raclopride (de 0,01 nM a 3 μ M) realitzats en absència o en presència de CGS 21680 (3 μ M) o de cafeïna (3 mM), s'han

obtingut corbes de competició monofàsiques ($D_c = 0$). El valor de K_{DA1} obtingut per a l'ajust d'aquestes dades a l'Eq 5b (veure *Materials i mètodes*) apareix a la Taula 1 i indica que tant el CGS 21680 com la cafeïna disminueixen significativament l'afinitat dels receptors D_2 estriatals per al [3H]raclopride.

Taula 1. Constants de l'equilibri de dissociació (K_{DA1}) de la unió de [3H]raclopride o [3H]quinpirole al receptor D_2 en absència (control) o en presència dels lligands del receptor A_{2A} .

Treatment	[3H]raclopride binding K_{DA1} (nM)	[3H]quinpirole binding K_{DA1} (nM)
Control	1.8 ± 0.7	5 ± 2
CGS 21680 (3 μM)	4.2 ± 0.7*	10 ± 2*
Caffeine (3 mM)	3.7 ± 0.7*	14 ± 3*

Els valors són la mitjana ± SEM de tres experiments. Els valors són les mitjanes ±SEM de tres experiments (* $p < 0.05$ respecte al control).

En els experiments amb cèl·lules cotransfectades ja s'ha demostrat que els efectes mediats per la cafeïna sobre la unió d'antagonistes i agonistes al receptor D_2 de dopamina està basada en la seva capacitat per unir-se a A_{2A} . De totes maneres, és un antagonista no selectiu i a l'estriat, també s'uneix als receptors A_1 . Per tant, hem comprovat l'absència d'efecte d'alguns lligands del receptor A_1 sobre la unió dels agonistes al receptor D_2 . S'han realitzat experiments de competició de [3H]raclopride (2 nM) amb concentracions creixents dels agonistes del receptor A_1 R-PIA (Sigma, St. Louis, EUA) o CCPA (Sigma, St. Louis, EUA). A la Fig. 6 (a i b) es mostra que els agonistes del receptor A_1 no modulen la unió dels antagonistes de D_2 . Quan s'ha usat l'antagonista del receptor A_1 DPCPX (Tocris, Ellisville, EUA) com a competidor, les concentracions de DPCPX fins a 100 nM, que poden saturar el receptor A_1 en més d'un 99% no afecten a la unió de [3H]raclopride (Fig. 6c). No obstant, concentracions més altes d'aquest lligand poden disminuir significativament la unió de [3H]raclopride (Fig. 6c) degut a que, a concentracions relativament altes, el DPCPX pot unir-se al receptor A_{2A} . De fet, concentracions altes de DPCPX desplacen la unió de [3H]ZM 241385 en experiments de competició (Fig. 6d). En aquest últim cas, ajustant les dades a l'Eq. 5 (*Materials i mètodes*) s'ha obtingut una $K_{DB1} = 50 ± 4$ nM. Tots aquests resultats en conjunt demostren que els lligands (agonistes o antagonistes) que s'uneixen al receptor A_{2A} i no els que ho fan només al receptor A_1 actuen com a moduladors de la unió als receptors D_2 .

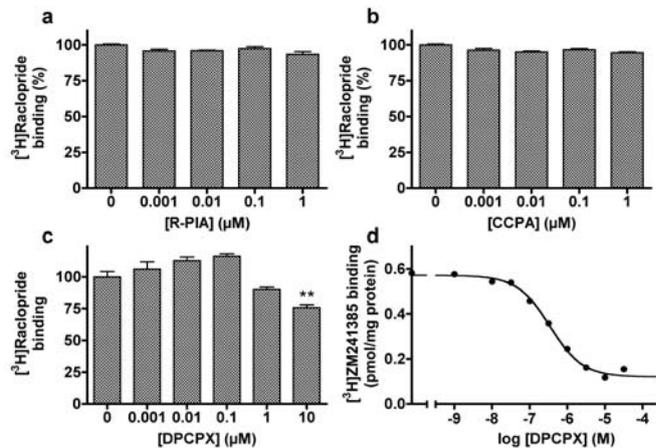


Figura 6. Efecte de la unió dels lligands del receptor A_1 en la unió de $[^3H]$ raclopride a membranes estriatals de xai. S'ha determinat la unió de $[^3H]$ raclopride en presència o en absència de les concentracions indicades de R-PIA (a), CCPA (b) o DPCPX (c) a membranes estriatals de xai (veure *Materials i mètodes*). La unió específica està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands del receptor A_{2A} . A (d) es representa l'experiment de competició de $[^3H]$ ZM 241385 versus DPCPX en les mateixes condicions experimentals (veure *Materials i mètodes*). Les dades són els valors \pm SEM dels triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de les mostres sense lligands del receptor A_1 s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$).

Per evaluar l'efecte dels lligands del receptor A_{2A} sobre la unió dels agonistes al receptor D_2 , s'han realitzat experiments incubant les membranes estriatals de xai amb l'agonista del receptor D_2 marcat radioactivament $[^3H]$ quinpirole (6nM) i concentracions creixents de CGS 21680 (Fig. 7a) o cafeïna (Fig. 7b). Ambdós lligands han disminuït significativament la unió de $[^3H]$ quinpirole als receptors D_2 . A més, igual que en els experiments amb cèl·lules CHO cotransfectades, el CGS 21680 i la cafeïna han estat més potents modulant la unió de $[^3H]$ quinpirole que la de $[^3H]$ raclopride. Per estudiar si el descens en la unió de l'agonista és degut a un augment de la constant d'afinitat del receptor D_2 pel quinpirole s'han realitzat experiments de competició de la unió de $[^3H]$ quinpirole (6nM) *versus* concentracions creixents de quinpirole (de 0,01 nM a 3 μ M; Tocris, Ellisville, EUA) en absència o en presència de CGS 21680 (3 μ M) o cafeïna (3 mM). A la concentració baixa de $[^3H]$ quinpirole usada, les corbes de competició són monofàsiques ($D_C = 0$) degut a l'extremadament baixa unió de $[^3H]$ quinpirole al segon protòmer del dímer, per tant s'han ajustat les dades a l'Eq. 5b (*Materials i mètodes*). Els valors de K_{DB1} obtinguts apareixen a la Taula 1 i indiquen que el CGS 21680 i la cafeïna redueixen significativament l'afinitat dels receptors D_2 estriatals pel $[^3H]$ quinpirole.

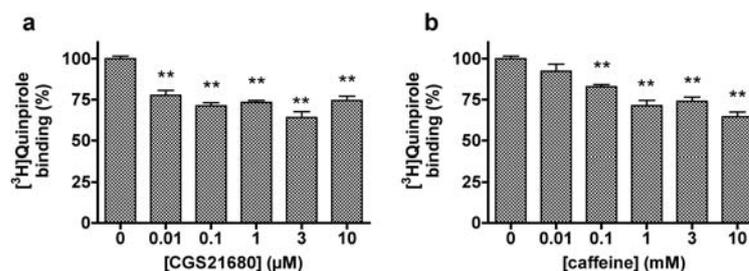


Figura 7. Efecte de la unió dels lligands del receptor A_{2A} en la unió de [3 H]quinpirole a membranes estriatals de xai. S'ha determinat la unió de [3 H]quinpirole en presència o en absència de les concentracions indicades de CGS 21680 (a) o cafeïna (b) a membranes estriatals de xai (veure *Materials i mètodes*). La unió específica està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands del receptor A_{2A} . Les dades són els valors \pm SEM dels triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de les mostres sense lligands d' A_{2A} s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$).

5.3 L'heteròmer A_{2A} - D_2 al nucli caudat humà.

Tal com s'ha establert recentment, la identificació d'una propietat bioquímica característica d'un heteròmer de receptors pot ser usada com una empremta dactilar (un *fingerprint*) bioquímica per determinar de la seva presència en teixits nadius (Ferré et al., 2009). Com que tal com s'ha descrit anteriorment, les interaccions al·lostèriques entre els receptors A_{2A} i D_2 a l'heteròmer A_{2A} - D_2 constitueixen propietats bioquímiques d'aquest heteròmer, s'han utilitzat aquestes propietats per detectar l'heteròmer A_{2A} - D_2 en l'estriat cerebral humà (nucli caudat). Els experiments s'han realitzat incubant membranes del nucli caudat humà amb [3 H]raclopride (2 nM) i concentracions creixents dels lligands del receptor A_{2A} CGS 21680 i cafeïna, o de l'agonista del receptor A_1 CCPA com a control negatiu (Fig. 8). Tant el CGS 21680 com la cafeïna disminueixen la unió de [3 H]raclopride als receptors D_2 amb la mateixa potència que en les membranes d'estriat de xai i en cèl·lules cotransfectades. Tal com s'esperava, l'agonista del receptor A_1 , CCPA, no modula la unió de l'antagonista als receptors D_2 . Aquests resultats proporcionen la primera evidència de l'existència del heteròmers de receptors A_{2A} - D_2 a l'estriat humà.

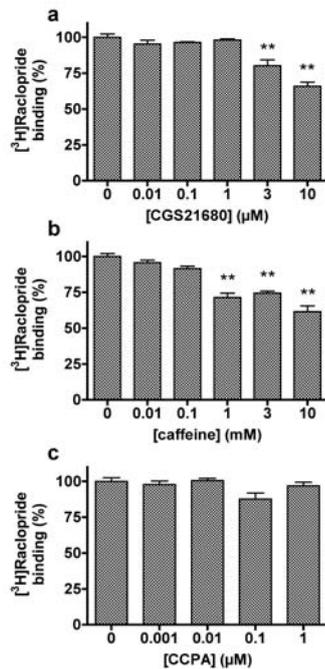


Figura 8. Efecte de la unió de lligands als receptors A_{2A} i A_1 en la unió de $[^3H]$ raclopride a membranes de nucli caudat humà. S'ha determinat la unió de $[^3H]$ raclopride en presència o en absència de les concentracions indicades dels lligands del receptor A_{2A} CGS 21680 (a) o cafeïna (b) i de l'agonista del receptor A_1 CCPA (c) en membranes del nucli caudat humà (veure *Materials i mètodes*). La unió específica està representada com el percentatge de la unió respecte les mostres en absència de lligands dels receptors A_{2A} o A_1 . Les dades són els valors \pm SEM de triplicats. Les diferències significatives respecte les mostres en absència de lligands d' A_{2A} o d' A_1 s'han calculat segons el test t de Student (* $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$).

5.4 Discussió

Una propietat important dels heteròmers de receptors és la capacitat per establir interaccions al·lostèriques entre els monòmers i aquesta capacitat confereix característiques farmacològiques i funcionals específiques de l'heteròmer (Casadó et al., 2007; Casadó et al., 2009, *Capítol 2*). En aquest estudi ens hem focalitzat en aquestes propietats per als heteròmers de receptors d'adenosina i de dopamina A_{2A} - D_2 . En cultius cel·lulars, primer s'ha demostrat que la unió de qualsevol lligand (agonista o antagonista) al receptor A_{2A} pot fer disminuir la unió de qualsevol lligand (agonista o antagonista) al receptor D_2 . En segon lloc, s'ha establert que aquestes interaccions són conseqüència de les interaccions al·lostèriques entre ambdós receptors en l'heteròmer A_{2A} - D_2 i que constitueixen propietats bioquímiques característiques d'aquest heteròmer. Seguidament en teixits *ex vivo*, s'ha demostrat que la unió dels agonistes i els antagonistes del receptor A_{2A} –però no del receptor A_1 – redueixen l'afinitat tant dels agonistes com dels antagonistes del receptor D_2 en membranes estriatals

de xai on prèviament s'havia descrit l'heteròmer A_{2A} - D_2 (Soriano et al., 2009) i usant aquestes interaccions al·lostèriques com a empremta dactilar de l'heteròmer, s'ha demostrat l'expressió de l'heteròmer de receptors A_{2A} - D_2 a l'estriat humà.

Tant l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 com l'antagonista no selectiu cafeïna, la droga psicoactiva més consumida del món, redueixen l'afinitat del receptor D_2 per als seus agonista o antagonista tritiats [3 H]quinpirole i [3 H]raclopride. En aquest estudi s'ha demostrat que aquestes interaccions entre els receptors A_{2A} i D_2 són interaccions al·lostèriques entre les diferents unitats en l'heteròmer A_{2A} - D_2 i que en constitueixen una propietat bioquímica. De fet, s'ha descrit que trobar una correlació entre canvis significatius a l'estructura quaternària de l'heteròmer i canvis significatius en la farmacologia o la funció del receptor permet establir les propietats bioquímiques d'aquest heteròmer (Ferré et al., 2009). Seguint aquest concepte, s'ha usat el receptor A_{2A}^{A374} (amb una mutació puntual de la Ser374 localitzada al seu domini C-terminal). Aquesta mutació comporta una disminució en els valors de BRET que implica un canvi significatiu en l'estructura quaternària de l'heteròmer A_{2A} - D_2 disrompent la interacció electrostàtica intracel·lular de l'heteròmer (Navarro et al., 2010; Borroto-Escuela et al., 2010). Tal com s'esperava, s'ha observat un descens en el BRET per a la parella A_{2A}^{A374} -RLuc/ D_2 -YFP comparada a la parella la parella A_{2A} -RLuc/ D_2 -YFP i aquest canvi en l'estructura quaternària ha resultat en la inhibició de les interaccions al·lostèriques a l'heteròmer. Per tant, les interaccions al·lostèriques que s'han descrit en aquest estudi constitueixen una característica bioquímica de l'heteròmer de receptors A_{2A} - D_2 . En aquest estudi hem usat aquesta característica per a detectar i caracteritzar els heteròmers A_{2A} - D_2 a l'estriat cerebral de xai, i el que és més important, al nucli caudat del cervell humà. En les membranes del nucli caudat humà, el CGS 21680 i la cafeïna redueixen l'afinitat del receptor D_2 per al [3 H]raclopride amb pràcticament el mateix rang concentració-resposta trobat en les preparacions de membranes de cèl·lules CHO que expressen els heteròmers A_{2A} - D_2 . I per tant, el fet de trobar aquest *fingerprint* en aquestes membranes dóna, per primer cop, una prova de l'existència dels receptors heteromèrics A_{2A} - D_2 al cervell humà.

Els resultats anteriorment comentats són rellevants considerant que els receptors A_{2A} i D_2 de l'estriat són diana de molts fàrmacs per combatre afeccions neurològiques humanes, com ara desordres psiquiàtrics, addicció a les drogues, o malalties neurodegeneratives i que són el focus primari de molta recerca biomèdica i farmacèutica (Thaker, 2007; Cristalli et al., 2009; Pinna, 2009;

Millan, 2010; Lopes et al., 2011). De fet, els heteròmers tenen característiques bioquímiques úniques que són diferents de les de les seves unitats individuals (Ferré et al., 2009). Aquestes propietats, incloent les modulacions al·lostèriques entre unitats que es descriuen aquí, poden ser fonamentals en el descobriment de nous fàrmacs ja que els paràmetres farmacològics d'un fàrmac seleccionat, per exemple per estratègies HTS (*High-throughput screening* o cribratge d'alt rendiment) usant receptors expressats individualment en una línia cè·l·lular, poden ser molt diferents dels paràmetres farmacològics reals del receptor en teixit natiu on el receptor s'expressa formant heteròmers amb un altre receptor i en presència o en absència de lligands d'aquest altre receptor (Ferré et al., 2009; Casadó et al., 2009a i b). En aquest marc, un aspecte interessant és que una interacció al·lostèrica entre protòmers d'un heteròmer s'ha d'interpretar com una interacció intramolecular en la que la unió d'un lligand a una de les unitats de receptor del heteròmer canvia les propietats de la unió a l'altra unitat de receptor (Ferré et al., 2009). Algunes troballes anteriors demostraven que l'agonista del receptor A_{2A} disminuïa la unió d'agonistes al receptor D_2 i es va suggerir que aquesta interacció al·lostèrica podia ser un mecanisme clau involucrat en els efectes depressius de l'aparell motor dels agonistes del receptor A_{2A} i dels efectes estimulants dels antagonistes del receptor A_{2A} com la cafeïna (Ferré et al., 2008) o en la depleció induïda pels agonistes del receptor A_{2A} de la inhibició que media el receptor D_2 sobre l'excitació neuronal per NMDA (Schiffmann et al., 2007). Aquesta interacció al·lostèrica agonista-agonista també s'ha considerat com el mecanisme principal responsable dels efectes antiparkinsonians dels antagonistes del receptor A_{2A} (Ferré et al., 2004, 2008; Muller i Ferré, 2007). Fins ara, els antagonistes del receptor A_{2A} no s'havien considerat capaços d'induir interaccions al·lostèriques directes en l'heteròmer A_{2A} - D_2 i eren considerats només com a molècules que podien desplaçar la unió dels agonistes endògens i, consegüentment, bloquejar les interaccions al·lostèriques agonista-agonista a l'heteròmer A_{2A} - D_2 . Els nostres resultats demostren, per primer cop, que una interacció al·lostèrica a l'heteròmer no només implica unes interaccions agonista-agonista sinó també interaccions agonista-antagonista i antagonista-antagonista en membranes cè·l·lulars i cerebrals, incloent les d'estriat humà. Per tant, la unió d'un antagonista a la unitat A_{2A} del heteròmer també redueix la unió dels agonistes i antagonistes a la unitat D_2 . Aquest comportament, ha de ser tingut en compte quan s'analitzen els efectes funcionals i farmacològics dels lligands del receptor A_{2A} , i en particular els dels antagonistes, en la funcionalitat dels receptors D_2 . A pesar d'això cal no oblidar que no només hi ha les interaccions al·lostèriques

sinó que també s'ha de tenir en compte un complex cross-talk molecular entre receptors en l'heteròmer que pot tenir conseqüències a nivell de senyalització que poden ser independents de les interaccions al·lostèriques i poden explicar, al menys en part, el paper dels lligands del receptor A_{2A} en la modulació del receptor D_2 .

D'altra banda, un altre aspecte important d'aquests resultats és que poden tenir implicacions en el camp de la neuroimatge humana per PET (*Positron Emission Tomography*). En la tècnica de PET, sovint s'usa el [^{11}C]raclopride com a marcador dels receptors D_2 i el consum de cafeïna no acostuma a ser controlat quan s'usa aquest lligand. S'han realitzat alguns estudis de l'efecte de la cafeïna en el PET amb [^{11}C]raclopride i ja indicaven un descens en la unió de l'antagonista al receptor D_2 induïda per la cafeïna (Kaasinen et al., 2004a, b). Tenint en compte els resultats que es descriuen aquí, aquest descens en la unió de [^{11}C]raclopride pot ser intepretat com una acció de la cafeïna sobre els receptors heteromèrics A_{2A} - D_2 al cervell humà. De totes maneres, en els estudis de PET només s'evaluava l'efecte d'una dosi oral de cafeïna en bevedors habituals de cafè després de 24 hores d'abstinència de cafeïna (Kaasinen et al., 2004a, b) i els resultats són difícils d'interpretar en quan que la unió de [^{11}C]raclopride només es veu significativament modificada en àrees talàmiques i els efectes de la cafeïna en alguns casos poden ser reproduïrs per *placebo* (Kaasinen et al., 2004^a, b). De totes maneres, els resultats descrits en el nostre estudi indiquen que s'ha de tenir en compte l'efecte de la cafeïna mediat pels heteròmers de receptors A_{2A} - D_2 en els experiments de PET amb [^{11}C]raclopride i ressalten que paràmetres com el consum habitual de cafè, els períodes d'abstinència o les diferents dosis de cafeïna han de ser tingudes en consideració quan es realitzin aquest tipus d'estudis.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 5

- [1] Azdad K, Gall D, Woods AS, Ledent C, Ferre S, Schiffmann SN. Dopamine D_2 and adenosine A_2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A_2A - D_2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:972-86.
- [2] Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Gomez-Soler M, Corrales F, Marcellino D, et al. Characterization of the A_2A R- D_2 R interface: focus on the role of the C-terminal tail and the transmembrane helices. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;402:801-7.
- [3] Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:131-7.

- [4] Canals M, Burgueno J, Marcellino D, Cabello N, Canela EI, Mallol J, et al. Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* 2004;88:726-34.
- [5] Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 2003;278:46741-9.
- [6] Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 2008;5:727-33.
- [7] Casado V, Canti C, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J Neurosci Res* 1990;26:461-73.
- [8] Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, et al. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 2007;116:343-54.
- [9] Casado V, Cortes A, Mallol J, Perez-Capote K, Ferre S, Lluís C, et al. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol Ther* 2009;124:248-57.
- [10] Casado V, Ferrada C, Bonaventura J, Gracia E, Mallol J, Canela EI, et al. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem Pharmacol* 2009;78:1456-63.
- [11] Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, Goldberg SR, et al. 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* 2004;76:5354-63.
- [12] Cristalli G, Muller CE, Volpini R. Recent developments in adenosine A2A receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2009:59-98.
- [13] DeLong MR, Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 2007;64:20-4.
- [14] Ferre S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* 2009;5:131-4.
- [15] Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2004;10:265-71.
- [16] Ferre S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* 2007;30:440-6.
- [17] Ferre S, Quiroz C, Woods AS, Cunha R, Popoli P, Ciruela F, et al. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* 2008;14:1468-74.
- [18] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, et al. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 2006;69:1905-12.
- [19] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, et al. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem Sci* 2005;30:360-6.
- [20] Gerfen CR. *Basal Ganglia*: Elsevier Academic Press, 2004.
- [21] Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J* 2008;27:2293-304.

- [22] Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* 2009;5:688-95.
- [23] Higley MJ, Sabatini BL. Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci* 2010;13:958-66.
- [24] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091-7.
- [25] Kaasinen V, Aalto S, Nagren K, Rinne JO. Expectation of caffeine induces dopaminergic responses in humans. *Eur J Neurosci* 2004;19:2352-6.
- [26] Kaasinen V, Aalto S, Nagren K, Rinne JO. Dopaminergic effects of caffeine in the human striatum and thalamus. *Neuroreport* 2004;15:281-5.
- [27] Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K, Nakata H. Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:544-9.
- [28] Lopes LV, Sebastiao AM, Ribeiro JA. Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Curr Top Med Chem* 2011;11:1087-101.
- [29] Millan MJ. From the cell to the clinic: a comparative review of the partial D/Dreceptor agonist and alpha2-adrenoceptor antagonist, piribedil, in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 2010;128:229-73.
- [30] Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189-225.
- [31] Muller CE, Ferre S. Blocking striatal adenosine A2A receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007;2:1-21.
- [32] Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, et al. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 2010;285:27346-59.
- [33] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM. The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 2002;17:51-5.
- [34] Pinna A. Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1619-31.
- [35] Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1998;401:163-86.
- [36] Sarrio S, Casado V, Escriche M, Ciruela F, Mallol J, Canela EI, et al. The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A(1) adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane. *Mol Cell Biol* 2000;20:5164-74.
- [37] Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007;83:277-92.
- [38] Smith NJ, Milligan G. Allosteric at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. *Pharmacol Rev* 2010;62:701-25.
- [39] Soriano A, Ventura R, Molero A, Hoen R, Casado V, Cortes A, et al. Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J Med Chem* 2009;52:5590-602.
- [40] Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004;5:30-4.
- [41] Thaker GK. Schizophrenia endophenotypes as treatment targets. *Expert Opin Ther Targets* 2007;11:1189-206.
- [42] Trifilieff P, Rives ML, Urizar E, Piskrowski RA, Vishwasrao HD, Castrillon J, et al. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous

- dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 2011;51:111-8.
- [43] Waldhoer M, Fong J, Jones RM, Lunzer MM, Sharma SK, Kostenis E, et al. A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9050-5.

CAPÍTOL 6

La L-DOPA Inhibeix l'Expressió d'Heteròmers de receptors d'Adenosina A_{2A}-de Cannabinoïdes CB₁-de Dopamina D₂ en Models Animals de la Malaltia de Parkinson.

Un model àmpliament acceptat de la funció dels ganglis basals proposa que l'estimulació de les vies estriatals eferents directa i indirecta dóna com a resultat l'activació o inhibició motora, respectivament (Albin et al., 1989; DeLong, 1990) i que el correcte funcionament motor depèn de la influència balancejada d'aquestes vies en l'activitat neuronal de les estructures de sortida dels ganglis basals (Kravitz et al., 2010). En la malaltia de Parkinson (PD) aquest equilibri en els circuits dels ganglis basals es perd per culpa d'una depleció de dopamina a l'estriat causada per la degeneració de les neurones nigroestriatals dopaminèrgiques (Lewis et al., 2003; Obeso et al., 2008). Tal com avança el procés degeneratiu, la teràpia de reposició de la dopamina esdevé necessària per ajudar a alleujar la disfunció motora. La levodopa (L-DOPA) és encara l'agent més efectiu per a millorar els símptomes motors de la PD, ja que actua com a una font de dopamina al cervell capaç d'interaccionar amb els receptors de dopamina de les famílies *D₁-like* i *D₂-like* (Encarnación i Hauser, 2008), però el seu ús crònic està associat amb l'emergència de complicacions motores que inclouen fluctuació de resposta i discinèsies (Bezard et al., 2001). Encara que els mecanismes que condueixen a les complicacions motores no estan totalment elucidats, la discinèsia induïda per L-DOPA (LID) es creu que és el resultat dels efectes combinats del dany dopaminèrgic nigroestriatal i del tractament pulsàtil amb L-DOPA (Obeso et al., 2000; Cenci et al., 2007), i per tant s'ha realitzat un gran esforç per trobar nous compostos que en permetin la substitució. El desenvolupament de compostos no dopaminèrgics per ser utilitzats en teràpies basades en L-DOPA ha atret molt interès en els últims anys (Pinna et al., 2009; Gottwald i Aminoff, 2011). Entre les noves classes de drogues, els antagonistes

del receptor A_{2A} d'adenosina han sorgit com els millors candidats. El nostre grup, i altres, hem descrit l'existència d'interaccions antagonístiques entre els receptors A_{2A} i D_2 en els heteròmers A_{2A} - D_2 (Hillion et al., 2002; Canals et al., 2003; Ferré et al., 2004; Fuxe et al., 2007; Schiffmann et al., 2007). Aquest fet ha portat a pensar en els antagonistes del receptor A_{2A} com uns compostos que podrien evitar el descens de l'afinitat del receptor D_2 induït per l'adenosina endògena (Ferré et al., 1991; Ferré i Fuxe, 1992; Ferré et al., 2004; Müller i Ferré, 2007; Pinna, 2009). D'aquesta manera, els antagonistes del receptor A_{2A} , podrien revertir la inhibició tònica de l'adenosina sobre els receptors D_2 mitjançada pels heteròmers A_{2A} - D_2 (Schwarzschild et al., 2006). A més, el bloqueig dels receptors A_{2A} incrementa indirectament els efectes induïts per l'activació dels receptors D_1 a les neurones estriatonigrals (Pinna et al., 1996; Pollack et al., 1996). Per tot això, els antagonistes del receptor A_{2A} exerceixen una acció facilitadora de la transmissió dopaminèrgica que pot resultar en una activació motora.

Uns altres receptors involucrats en les alteracions motores en PD són els receptors de cannabinoides. En mostres de pacients o d'animals model de PD s'ha demostrat que el sistema cannabinoide està sobreactivat en estats avançats de la malaltia però, paradoxalment, les primeres fases de la PD estan associades a una regulació a la baixa dels receptors CB_1 (Sagredo et al., 2007), que podria fins i tot servir com un biomarcador en la fase inicial d'aquesta malaltia. Es pot assumir que aquesta regulació negativa dels receptors CB_1 podria fer les neurones estriatonigrals més vulnerables als estímuls citotòxics que operen en la PD (Sagredo et al., 2007). En contrast, quan apareixen els principals símptomes de la PD, el sistema endocannabinoide esdevé hiperactiu. En humans, això s'ha observat analitzant el nombre i la funcionalitat dels receptors CB_1 als ganglis basals *post mortem* (Lastres-Becker et al., 2001) i mesurant els nivells d'endocannabinoides en mostres de fluïd cerebroespinal (Pisani et al., 2005) de pacients de PD i en models animals de PD (García-Arencibia et al., 2009). A més, el fet que aquest tipus de resposta es veu generalment revertida amb el tractament amb L-DOPA recolza la noció de que la sobreactivació de la senyalització cannabinoide correlaciona inversament amb la denervació dopaminèrgica de l'estriat (Romero et al., 2000; Lastres-Becker et al., 2001) i recolza la teoria de que el bloqueig dels receptors CB_1 podria ser útil contra la bradicinèsia parkinsoniana (García-Arencibia et al., 2009; Orgado et al., 2009). Utilitzant una tècnica basada en la transferència d'energia per ressonància (Carriba et al., 2008) el nostre grup ha demostrat recentment que els receptors

CB₁ poden formar heteròmers amb els receptors A_{2A} d'adenosina i D₂ de dopamina. L'expressió dels heterotrímurs A_{2A}-CB₁-D₂ es va demostrar en cèl·lules transfectades i en estriat de ratolí (Navarro et al., 2010). L'heteròmer de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ està associat a un canvi qualitatiu important en la senyalització dels receptors i en la via de les MAPK i sembla que tant els agonistes del receptor A_{2A} com els del CB₁ modulen negativament la unió de lligands als receptors D₂ a l'heteròmer (Navarro et al., 2010, Higley et al., 2010; Marcellino et al., 2008). Tenint això en consideració, en aquest capítol s'ha estudiat l'expressió i la funció dels heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ a l'estriat de models primats i murins de PD. Hem comparat els resultats obtinguts amb animals control, animals lesionats i animals tractats amb L-DOPA després de la lesió, per investigar si l'heteròmer de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ és una diana real per a ser tinguda en consideració per al disseny de teràpies antidiscinètiques.

Els resultats d'aquest capítol es corresponen amb l'Objectiu 6 d'aquesta Tesi i formen part del treball **L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁-dopamine D₂ receptor heteromer in rat and monkey models of Parkinson disease** per J Bonaventura*, A J Rico*, E Moreno, S Sierra, M Sánchez, N Luquin, D Farré, A Cortés, J Mallol, M-T Armentero, A Pinna, E I. Canela, C Lluís, P J. McCormick, J L. Lanciego, V Casadó* i R Franco* (*co-autors) que està en fase d'escriptura per a la seva publicació a la revista *Journal of Neuroscience*.

6.1 Expressió dels heteròmers de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ a l'estriat de macacos .

El nostre grup ha identificat anteriorment la presència d'heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ tant en cèl·lules transfectades com en cervell de ratolí (Navarro et al., 2010). En aquest estudi, en primer lloc, s'ha investigat l'expressió d'aquests heteròmers a l'estriat de macacos de l'espècie *Macaca fascicularis*. Un avantatge de l'estriat de primats és la possibilitat de delinear millor diferents regions de l'estriat. Per identificar on es poden formar els complexos heteromèrics, s'ha separat el caudat del putamen i s'ha determinat la formació d'heteròmers entre els receptors A_{2A}, CB₁ i D₂ mitjançant assajos *in situ* de lligació per proximitat (PLA). Aquesta tècnica només permet la determinació d'interaccions moleculars entre dues proteïnes diferents. Per detectar els heteròmers A_{2A}-CB₁ s'ha usat com anticossos primaris la parella d'anticossos ratolí anti-A_{2A} (1:200; 05-717; Millipore, Billerica, EUA) i conill anti-CB₁ (1:200; ThermoScientific, Rockford, EUA), i per detectar els heteròmers A_{2A}-D₂ s'han usat els anticossos de conill anti-D₂ (1:200; AB5084P; Millipore, Billerica, EUA) i ratolí anti-A_{2A} i en cada cas

s'han detectat amb els anticossos secundaris contra ratolí o conill acoblats a les sondes de PLA (veure *Materials i Mètodes*). Per a detectar els heteròmers CB₁-D₂ s'han incubat els talls estriatals amb quantitats iguals dels anticossos de conill anti-CB₁ (1:100) i conill anti-D₂ (1:100) directament acoblats a les monocadenes de DNA “més” o DNA “menys”, respectivament (veure *Materials i Mètodes*). L'especificitat de l'anticòs de conill anti-CB₁ ha estat prèviament descrita (Callén et al., 2012) i els anticossos de ratolí anti A_{2A} i conill anti-D₂ ja havien estat caracteritzats anteriorment per a la tècnica de PLA (Trifilieff et al., 2011). Usant aquests anticossos i talls de caudat de macaco s'han detectat heteròmers A_{2A}-CB₁ (Fig. 1A), A_{2A}-D₂ (Fig. 1B) i CB₁-D₂ (Fig. 1C), que es visualitzen com a punts vermells al voltant dels nuclis tenyits amb DAPI amb un alt percentatge de cèl·lules amb una tinció relativament alta (Fig. 1G). La detecció d'heteròmers de cada parella entre A_{2A}, CB₁ i D₂ en quantitats similars suggereix l'expressió de l'heteròmer A_{2A}-CB₁-D₂ al caudat. En contrast i sorprenentment, quan s'estudien

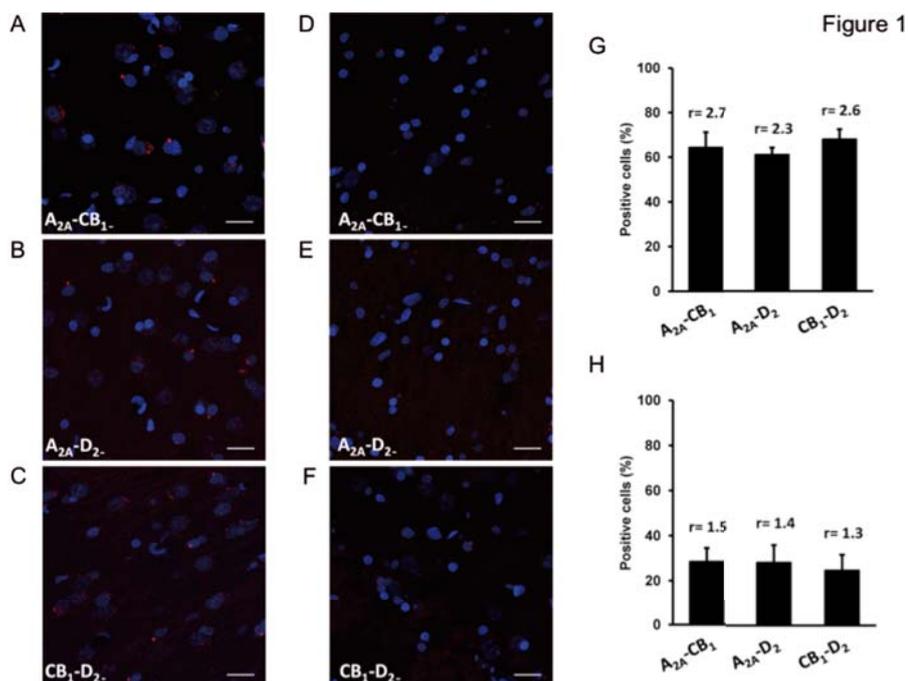


Figura 1. Expressió dels heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ a l'estriat de macacos. S'han realitzat els assajos de PLA *in situ* tal com s'indica a *Materials i mètodes* fent servir talls estriatals de nucli caudat (de A a C) o putamen (de D a F) de macacos i anticossos anti-A_{2A} i anti-CB₁ (A i D), anti-A_{2A} i anti-D₂ (B i E) o anti-CB₁ i anti-D₂ (C i F) com a anticossos primaris. Es mostren les seccions superimposades de les imatges de microscòpia confocal. Els heteròmers es detecten com a agrupacions vermelles, només a A, B i C. Barra d'escala de 20 μm. En tots els casos els nuclis cel·lulars s'han tenyit amb DAPI (blau). El percentatge de cèl·lules que contenen un o més punts vermells respecte al total de cèl·lules (nuclis blaus) es dona per al caudat (G) i putamen (H) així com el valor *r* (número de punts vermells / total de cèl·lules marcades) per a un conjunt de 250 a 300 cèl·lules de 3 camps diferents.

els talls de putamen la quantitat de punts vermells corresponent als heteròmers A_{2A} - CB_1 (Fig. 1D), A_{2A} - D_2 (Fig. 1E) i CB_1 - D_2 (Fig. 1F) es veu molt disminuïda (Fig. 1H), tan en el nombre de cèl·lules marcades com amb la intensitat de marca per cada cèl·lula indicant que els heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 no s'expressen al putamen. Com a controls negatius, els punts vermells no s'han observat en els talls que només han estat tractats amb els anticossos primaris contra A_{2A} i les sondes de DNA lligades als anticossos secundaris (Fig. S1 a l'Apèndix).

Freqüentment, una característica dels heteròmers de receptors és que la unió d'un lligand a un receptor modula la unió de lligands als altres receptors de l'heteròmer (Ferré et al., 2009). Aquesta interacció (*cross-talk*) bioquímica ha estat descrit anteriorment per als heteròmers A_{2A} - D_2 , on els lligands del receptor A_{2A} modulen negativament l'afinitat dels lligands del receptor D_2 (Ferré et al., 1991; 2007; Capítol 5). Per tant, per obtenir més proves de l'expressió dels heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 a l'estriat de macacos i de la seva funcionalitat, hem investigat el *cross-talk* a nivell d'unió de lligands entre els receptors A_{2A} , CB_1 i D_2 usant membranes del caudat i del putamen de macacos. S'han realitzat experiments de competició amb una concentració constant de l'antagonista del receptor D_2 marcat radioactivament [3 H]YM-09151-02 (0.5 nM) i concentracions creixents de dopamina (de 0.01 nM a 30 μ M) en absència (negre) o en presència (vermell) de l'agonista del receptor A_{2A} CGS 21680 (250 nM; Fig. 2A), de l'agonista del receptor CB_1 CP 55940 (100 nM; Tocris, Ellisville, EUA; Fig. 2B) o d'ambdós conjuntament (Fig. 2C) en membranes de caudat de macacos tal com s'ha descrit a *Materials i mètodes*. En totes les condicions s'han obtingut corbes de competició bifàsiques. Ajustant les dades d'unió a l'Eq. 2 (veure *Materials i mètodes*) s'han calculat les constants d'afinitat per la unió de la dopamina als receptors D_2 .

Taula 1. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB_1 sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D_2 en membranes de caudat de macaco. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments		Parameters		
[3 H]YM-09151-02 vs dopamine	B_{e1} (pmol/mg)	K_{D1} (nM)	B_{e2} (pmol/mg)	K_{D2} (nM)
Not treated	0.23 \pm 0.03	2 \pm 1	0.21 \pm 0.01	180 \pm 60
+ CGS 21680 (250nM)	0.30 \pm 0.01	7 \pm 2	0.10 \pm 0.01	700 \pm 100
+ CP 55940 (100nM)	0.30 \pm 0.02	7 \pm 2	0.05 \pm 0.04	700 \pm 400
+ CGS 21680 + CP 55940	0.22 \pm 0.02	1.7 \pm 0.5	0.187 \pm 0.002	320 \pm 150

Els valors representats són la mitjana \pm SEM de 3 experiments realitzats amb 3 animals.

Tal com es mostra a la Taula 1, no només l'agonista del receptor A_{2A} sinó que també l'agonista del receptor CB_1 indueixen un descens de més de 3 cops de l'afinitat de la dopamina pels receptors D_2 i aquest efecte es veu revertit quan hi ha la presència simultània d'ambdós agonistes. Aquests resultats es poden explicar per una interacció molecular receptor-receptor entre els receptors de l'heteròmer A_{2A} - CB_1 - D_2 en què la unió de l'agonista a un dels receptors indueix un canvi conformacional que és notat per els altres receptors de l'heteròmer. També s'han realitzat experiments de competició amb els mateixos lligands i en les mateixes condicions que els descrits anteriorment usant membranes de putamen precomissural o postcomissural. Tal com al caudat, les corbes de competició són bifàsiques i s'han ajustat les dades a l'Eq. 2. Les constants d'afinitat per la unió de la dopamina al receptor D_2 apareixen a la Taula 2.

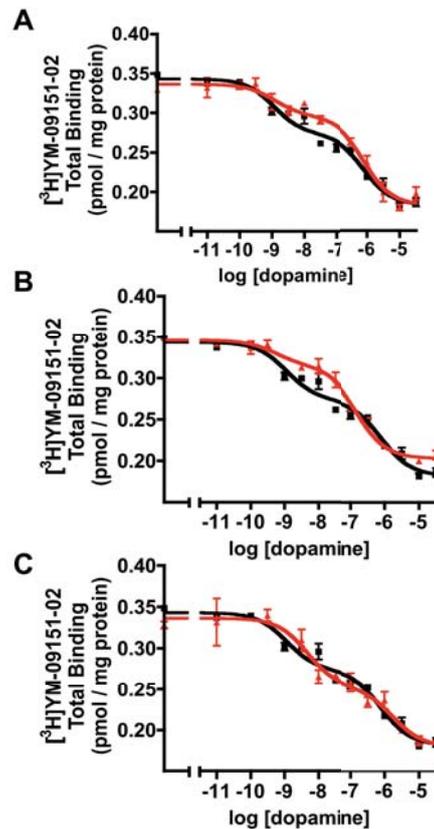


Figura 2. Corbes de competició de l'antagonista del receptor D_2 $[^3H]YM-09151-02$ i concentracions creixents de dopamina. Els assajos de competició s'han realitzat tal com s'indica a *Materials i mètodes* fent servir preparacions de membranes (0.3 mg de proteïna/ml) del caudat de macacos amb una concentració constant de $[^3H]YM-09151-02$ (0.5 nM) i concentracions creixents de dopamina (de 0.01 nM a 30 μ M) en absència (negre) o en presència (vermell) de CGS21680 (250 nM; A), CP 55940 (100 nM, B) o d'ambdós (C). Els valors representats són la mitjana \pm SEM d'un experiment representatiu realitzat per triplicat.

Al putamen, l'afinitat de la dopamina pels receptors D₂ no es veu modificada per la unió dels agonistes del receptor A_{2A} ni del CB₁, ni quan amdós hi són de manera simultània. Aquests resultats estan d'acord amb la molt baixa expressió de l'heteròmer de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ al putamen observada en els experiments de PLA i indiquen que només al caudat, i no al putamen, la unió de dopamina als receptors D₂ es veu modulada per l'activació individual de CB₁ o d'A_{2A} però que la coactivació d'ambdós receptors bloqueja aquesta modulació negativa. És important destacar que els canvis en l'heteromerització del receptors en putamen respecte al caudat no són deguts a la pèrdua d'expressió dels receptors. De fet, l'expressió realitva entre els receptors D₂ i A_{2A} és molt similar en ambdues regions (Fig. 3) mentre que l'expressió de CB₁ augmenta en putamen respecte del caudat (Fig. 3).

Taula 2. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D₂ en membranes de putamen precomissural i postcomissural de macaco. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments	Parameters			
	B _{e1} (pmol/mg)	K _{D1} (nM)	B _{e2} (pmol/mg)	K _{D2} (nM)
<i>Precomissural putamen</i>				
Not treated	0.17 ±0.04	4.0 ±1.0	0.12 ±0.03	350 ±140
+ CGS 21680 (250nM)	0.17 ±0.03	7.5 ±2.4	0.10 ±0.02	610 ±160
+ CP 55940 (100nM)	0.15 ±0.05	2.6 ±1.3	0.20 ±0.05	370 ±180
+ CGS 21680 + CP 55940	0.18 ±0.04	3.5 ±1.5	0.12 ±0.04	570 ±340
<i>Postcomissural putamen</i>				
Not treated	0.31 ±0.03	5.0 ±1.0	0.21 ±0.08	351 ±258
+ CGS 21680 (250nM)	0.29 ±0.01	3.0 ±1.7	0.16 ±0.04	434 ±200
+ CP 55940 (100nM)	0.28 ±0.02	3 ±1	0.16 ±0.03	505 ±221
+ CGS 21680 + CP 55940	0.30 ±0.06	5 ±3	0.22 ±0.05	174 ±17

Els valors representats per al putamen precomissural són la mitjana ± SEM de 7 determinacions realitzades amb 7 animals diferents, i per al putamen postcomissural són la mitjana ± SEM de 3 determinacions realitzades amb 3 animals diferents.

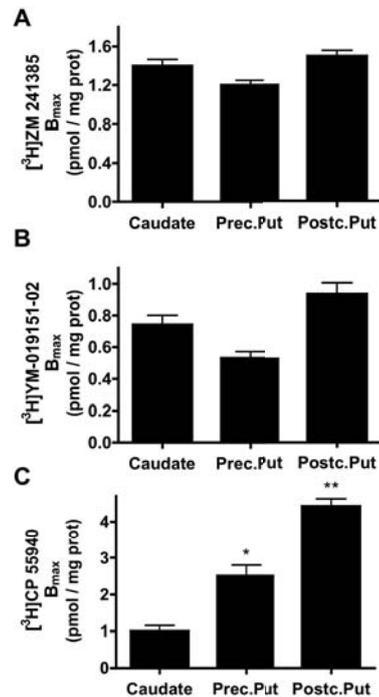


Figura 3. Expressió dels receptors A_{2A} , CB_1 i D_2 a l'estriat de macacos. La unió màxima s'ha calculat a partir d'experiments de competició en membranes (0.3 mg de proteïna/ml) de caudat o putamens pre- o post-comissural de macacos, amb l'antagonista del receptor A_{2A} [3H]ZM 241385 (4 nM; A), l'antagonista del receptor D_2 [3H]YM-09151-02 (0.5 nM; B) o l'agonista del receptor CB_1 [3H]CP 55940 (6 nM; C) *versus* una concentració 50 μ M dels mateixos lligands sense marcar radioactivament. Per al càlcul s'han considerat les següents constants d'afinitat: 1 nM per al ZM 241385, 0,6 nM per al YM-09151-02 i 4 nM per al CP 55940. Els valors són la mitjana \pm SEM de triplicats. La significança estadística s'ha calculat amb un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test post-hoc de comparació múltiple de Dunnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$, respecte al caudat).

6.2 Expressió dels heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 a l'estriat de macacos i rates models de PD.

Tenint en compte que els heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 s'expressen al caudat dels macacos, s'ha hipotitzat que aquest complex pot jugar un rol o estar alterat en la PD i pot servir com a una diana potencial de teràpia. Tenint en compte aquesta hipòtesi, s'ha investigat l'expressió dels heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 en talls de caudat de macacos lesionats amb MPTP, mitjançant PLA. S'han detectat els heteròmers A_{2A} - CB_1 (Fig. 4A), A_{2A} - D_2 (Fig. 4B) i CB_1 - D_2 (Fig. 4C) visualitzats com a punts vermells al voltant dels nuclis neuronals tenyits amb DAPI en un percentatge de cèl·lules i amb un nivell de tinció per cèl·lula (Fig. 4D) que no és significativament diferent dels macacos control. Aquests resultats suggereixen

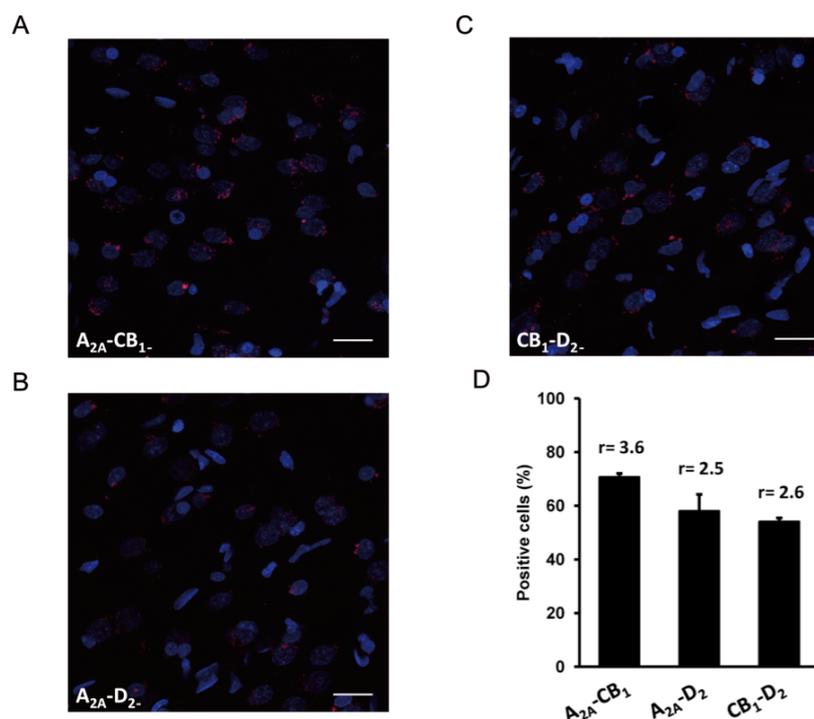


Figura 4. Expressió dels heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ al caudat de macacos lesionats amb MPTP. S'han realitzat els assajos de PLA *in situ* tal com s'indica a *Materials i mètodes* fent servir talls de nucli caudat de macacos lesionats amb MPTP i anticossos anti-A_{2A} i anti-CB₁ (A), anti-A_{2A} i anti-D₂ (B) o anti-CB₁ i anti-D₂ (C) com a anticossos primaris. Es mostren les seccions superimposades de les imatges de microscòpia confocal. Els heteròmers es detecten com a agrupacions vermelles. Barra d'escala de 20 μm. En tots els casos els nuclis cel·lulars s'han tenyit amb DAPI (blau). Al panell D es mostra el percentatge de cèl·lules que contenen un o més punts vermells respecte al total de cèl·lules (nuclis blaus) així com el valor *r* (número de punts vermells / total de cèl·lules marcades) per a un conjunt de 250 a 300 cèl·lules de 3 camps diferents.

que l'expressió de l'heteròmer A_{2A}-CB₁-D₂ també es dona al caudat dels animals parkinsonians. Paral·lelament, s'han determinat els canvis provocats pels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina pel receptor D₂ al caudat dels macacos lesionats amb MPTP. S'han realitzat experiments de competició amb una concentració constant de l'agonista del receptor D₂ marcat radioactivament [³H]YM-09151-02 (0.5 nM) *versus* concentracions creixents de dopamina (de 0.01 nM a 30 μM) en absència o en presència de CGS21680 (250 nM), de CP 55940 (100 nM) o ambdós simultàniament, tal com s'ha descrit a *Materials i mètodes*. En tots els casos s'han obtingut corbes de competició bifàsiques, i s'han ajustat les dades a l'Eq. 2 per tal de calcular les constants d'afinitat per a la unió de dopamina al receptor D₂ (Taula 3). De manera similar al que s'ha observat en els animals no lesionats, tant l'agonista del receptor A_{2A} com el del receptor CB₁ han provocat un descens en l'afinitat de la dopamina pels receptors D₂ del caudat, i aquest efecte s'ha vist revertit quan ambdós lligands han estat afegits simultàniament. Quan s'ha realitzat el mateix

Taula 3. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D₂ en membranes de caudat de macacos lesionats amb MPTP. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments	Parameters			
	[³ H]YM-09151-02 vs dopamine	B _{e1} (pmol/mg)	K _{D1} (nM)	B _{e2} (pmol/mg)
Not treated	0.27 ±0.02	9 ±3	0.06 ±0.02	2800 ±900
+ CGS 21680 (250nM)	0.34 ±0.02	23 ±5	0.04 ±0.02	5000 ±3000
+ CP 55940 (100nM)	0.32±0.03	21 ±4	0.05 ±0.01	4000 ±1000
+ CGS 21680 + CP 55940	0.26 ±0.02	9 ±3	0.06 ±0.02	2600 ±900

Els valors representats són la mitjana ± SEM de 3 experiments realitzats amb 3 animals diferents.

experiment en membranes de putamen pre- i postcomissural de macacos parkinsonians, les constants d'afinitat pels receptors D₂ no s'han modificat en presència dels agonistes dels receptors A_{2A} o CB₁ (Taula S1). El fet que s'observi un comportament similar en la unió de lligands a l'heteròmer de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ en monos control i parkinsonians indica que la lesió no canvia la funció de l'heteròmer, i que per tant l'heteròmer de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ pot ser una diana real per al tractament de la PD. Per reforçar la hipòtesi anterior, hem testat un altre model animal de la PD: les rates lesionades amb 6-hidroxidopamina (6-OHDA; veure *Materials i mètodes*). S'han realitzat experiments de competició utilitzant membranes estriatals de rates no lesionades (*control*) o membranes hemiestriatals del costat no-lesionat (*unlesioned*) o lesionat (*lesioned*) de rates lesionades amb 6-OHDA amb una concentració constant de l'antagonista del receptor D₂ marcat radioactivament [³H]YM-09151-02 i concentracions creixents de dopamina (de 0.01 nM a 30 μM) en absència o en presència de CGS 21680 (250 nM), de CP 55940 (100 nM) o d'ambdós simultàniament. En tots els casos s'han obtingut corbes de competició bifàsiques, i ajustant les dades a l'Eq. 2 s'han calculat les constants d'afinitat de la dopamina pel receptor D₂ que apareixen a la Taula 4. En les rates control o als hemi-estriats no lesionats, tant l'agonista del receptor A_{2A} com el del receptor CB₁ indueixen un descens en l'afinitat de la dopamina pels receptors D₂, un efecte que es veu parcialment revertit quan ambdós agonistes d'afegeixen simultàniament. S'obtenen resultats similar en les membranes hemi-estriatals del costat lesionat amb 6-OHDA, excepte que el descens en l'afinitat no es veu revertit amb l'addició simultània dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁. Aquests resultats són molt similars als obtinguts amb macacos i reforça la idea que els heteròmers de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ poden ser una diana real per al tractament de la PD.

6.3 *El tractament amb L-DOPA inhibeix la formació d'heteròmers de receptors A_{2A}-CB₁-D₂ en models animals de PD.*

En PD, la teràpia de reposició de la dopamina amb L-DOPA és encara la més efectiva per millorar la hipocinèsia associada a la malaltia, però el seu ús crònic està associat a complicacions motores que inclouen discinèsies (Obeso et al., 2000). Tenint en compte els resultats abans esmentats ens hem preguntat si aquestes discinèsies estan associades a canvis en la funció dels heteròmers de receptors A_{2A}-CB₁-D₂. Per tal de respondre a aquesta pregunta s'han usat talls de caudat de macacos amb una discinèsia induïda per L-DOPA (veure *Materials i mètodes*) i s'hi ha testat l'expressió dels heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ per PLA. Als talls de caudat de macacos discinètics l'expressió dels heteròmers entre A_{2A}-CB₁ (Fig. 5A), A_{2A}-D₂ (Fig. 5B) i CB₁-D₂ (Fig. 5C) es veu dramàticament disminuïda (Fig. 5D) en comparació amb la dels animals control

Taula 4. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D₂ en membranes d'estriat de rates lesionades o no amb 6-OHDA. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments		Parameters		
[³ H]YM-09151-02 vs dopamine	B _{e1} (pmol/mg)	K _{D1} (nM)	B _{e2} (pmol/mg)	K _{D2} (nM)
<i>Control rats</i>				
Not treated	0.06 ±0.01	2.1 ±1.6	0.31 ±0.01	500 ±100
+ CGS 21680 (250nM)	0.11 ±0.05	20 ±17	0.18 ±0.04	650 ±430
+ CP 55940 (100nM)	0.12 ±0.03	19 ±9	0.20 ±0.02	1600 ±900
+ CGS 21680 + CP 55940	0.09 ±0.02	6.2 ±3.7	0.23 ±0.02	470 ±140
<i>6-OHDA Lesioned Rats (Unlesioned side)</i>				
Not treated	0.11 ±0.02	0.9 ±0.4	0.28 ±0.02	100 ±40
+ CGS 21680 (250nM)	0.26 ±0.03	9 ±3	0.13 ±0.03	570 ±40
+ CP 55940 (100nM)	0.16 ±0.06	11 ±3	0.21 ±0.02	1000 ±300
+ CGS 21680 + CP 55940	0.21 ±0.02	3 ±1	0.18 ±0.02	190 ±90
<i>6-OHDA Lesioned Rats (Lesioned side)</i>				
Not treated	0.17 ±0.03	0.5 ±0.3	0.34 ±0.03	210 ±30
+ CGS 21680 (250nM)	0.37 ±0.03	11.1 ±2.6	0.19 ±0.05	640 ±250
+ CP 55940 (100nM)	0.36 ±0.02	8.5 ±1.5	0.22 ±0.05	3200 ±1200
+ CGS 21680 + CP 55940	0.33 ±0.02	13.0 ±2.7	0.15 ±0.03	1300 ±500

Els valors representats són la mitjana ± SEM de 3 experiments realitzats amb un total de 30 animals de cada condició.

(veure Fig. 1) no només en el número de cèl·lules que expressen heteròmers sinó també en la quantitat de heteròmers per cèl·lula que els expressa. Per tant, sembla que la condició de discinèsia bloqueja la formació de l'heterotrímer. Per corroborar-ho s'han realitzat experiments per estudiar el *cross-talk* entre els receptors a nivell d'unió de lligands usant membranes de caudat de macacos lesionats amb MPTP i tractats amb L-DOPA. S'han dut a terme experiments de competició amb l'antagonista del receptor D₂ marcat radioactivament [³H]-YM-09151-02 (0.5 nM) versus concentracions creixents de dopamina (de 0.01 nM a 30 μM) en absència o en presència de CGS21680 (250 nM), CP 55940 (100 nM) o d'ambdós simultàniament. En tots els casos s'han obtingut corbes de competició bifàsiques, i ajustant les dades a l'Eq. 2 s'han calculat les constants d'afinitat de la dopamina pel receptor D₂ que apareixen a la Taula 5. De manera interessant, en aquestes condicions de discinèsia l'afinitat de la dopamina pel

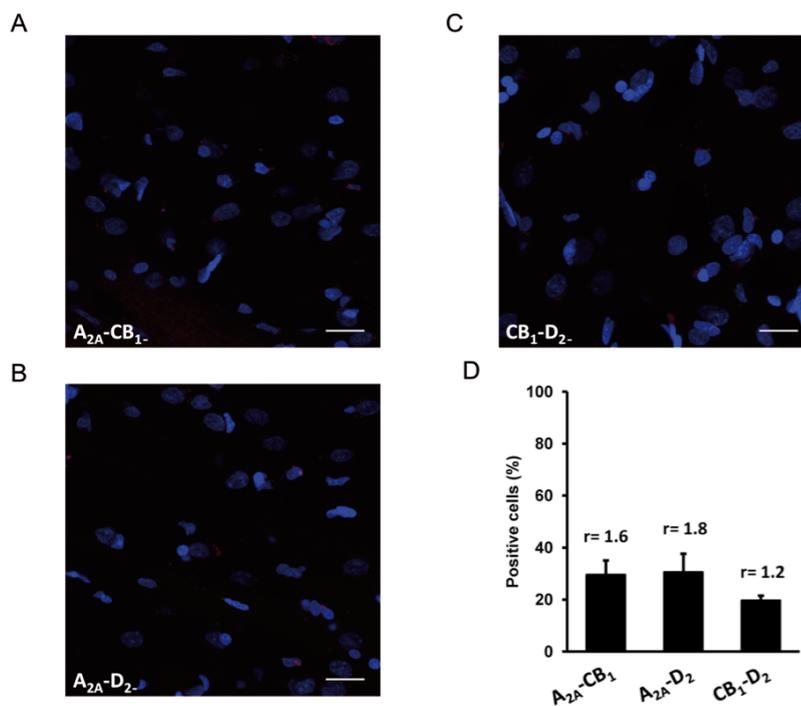


Figura 5. Expressió dels heteròmers A_{2A}-CB₁-D₂ al caudat de macacos discinètics. S'han realitzat els assajos de PLA *in situ* tal com s'indica a *Materials i mètodes* fent servir talls de nucli caudat de macacos que presentaven discinèsia induïda per L-DOPA i anticossos anti-A_{2A} i anti-CB₁ (A), anti-A_{2A} i anti-D₂ (B) o anti-CB₁ i anti-D₂ (C) com a anticossos primaris. Es mostren les seccions superimposades de les imatges de microscòpia confocal. Els heteròmers es detecten com a agrupacions vermelles. Barra d'escala de 20 μm. En tots els casos els nuclis cel·lulars s'han tenyit amb DAPI (blau). Al panell D es mostra el percentatge de cèl·lules que contenen un o més punts vermells respecte al total de cèl·lules (nuclis blaus) així com el valor *r* (número de punts vermells / total de cèl·lules marcades) per a un conjunt de 250 a 300 cèl·lules de 3 camps diferents.

receptor D₂ no ha estat modificada per la unió de l'agonista del receptor A_{2A} i/o del receptor CB₁, indicant una pèrdua del *cross-talk* funcional entre receptors que es correspon amb la pèrdua de la formació d'heteròmers detectada per PLA. És important apuntar que aquests canvis en la heteromerització en macacos discinètics no són deguts en canvis els nivells d'expressió relativa entre els animals no-lesionats, lesionats amb MPTP i els discinètics, ja que els l'expressió relativa dels tres receptors és similar (Fig. S2). D'acord amb la manca d'heteromerització entre receptors al putamen de macacos (veure Fig. 1), l'afinitat de la dopamina no es veu afectada per la unió dels agonistes d'A_{2A} o de CB₁ al putamen pre- o postcomissural de macacos discinètics (Taula S2, a l'Apèndix). Paral·lelament hem investigat si aquesta pèrdua del *cross-talk* entre receptors induïda per L-DOPA es pot observar en un altre model animal de la PD. De fet, s'han obtingut resultats similars usant rates lesionades amb 6-OHDA i tractades de manera aguda o crònica amb L-DOPA. Les constants d'afinitat per la unió de la dopamina als receptors D₂ que s'han obtingut d'experiments de competició amb una concentració constant de l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (0,5 nM) i concentracions creixents de dopamina (de 0,01 nM a 30 µM) en absència o en presència de CGS21680 (250 nM), CP 55940 (100 nM) o ambdós, apareixen a la Taula 6. El descens de l'afinitat de la dopamina pels receptors D₂ induïda pels agonistes d'A_{2A} i de CB₁ sols o en combinació que es veia en els animals control o lesionats amb 6-OHDA s'ha vist molt disminuït tant en les membranes dels costats lesionat i no lesionat dels animals tractats amb L-DOPA, suggerint que aquest efecte pot ser degut al tractament amb L-DOPA més que a la lesió. És important destacar que els canvis en el *cross-talk* en les rates tractades amb L-DOPA no són deguts a canvis en els nivells d'expressió dels receptors, ja que és similar en tots els casos (Figura 6). S'ha observat un lleuger increment en l'expressió dels receptors D₂ i CB₁ en els costats lesionats

Taula 5. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D₂ en membranes de caudat de macacos discinètics (lesionats amb MPTP i tractats amb L-DOPA). Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments		Parameters		
[³ H]YM-09151-02 vs dopamine	B _{e1} (pmol/mg)	K _{D1} (nM)	B _{e2} (pmol/mg)	K _{D2} (nM)
Not treated	0.30 ± 0.02	5 ± 3	0.17 ± 0.01	800 ± 400
+ CGS 21680 (250nM)	0.26 ± 0.02	5 ± 2	0.21 ± 0.06	1000 ± 600
+ CP 55940 (100nM)	0.30 ± 0.05	6 ± 3	0.18 ± 0.01	1500 ± 1000
+ CGS 21680 + CP 55940	0.22 ± 0.01	2 ± 1	0.22 ± 0.03	300 ± 90

Els valors representats són la mitjana ± SEM de 2 experiments realitzats amb 2 animals diferents.

respecte als costats no-lesionats però aquest increment no pot ser el responsable de la pèrdua de *cross-talk* ja que s'observa tant en rates tractades com no amb L-DOPA. Globalment, aquests resultats són molt similars als obtinguts en macacos indicant que la pèrdua del *cross-talk* funcional entre els receptors s'observa en diferents models animals de discinèsia.

Taula 6. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB₁ sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D₂ en membranes d'estriat de rates lesionades o no amb 6-OHDA i tractades amb L-DOPA de manera aguda o crònica. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments		Parameters		
[³ H]YM-09151-02 vs dopamine	B _{e1} (pmol/mg)	K _{D1} (nM)	B _{e2} (pmol/mg)	K _{D2} (nM)
<i>Acute L-DOPA rats (Unlesioned Side)</i>				
Not treated	0.20 ± 0.01	2.5 ± 0.3	0.16 ± 0.02	190 ± 100
+ CGS 21680 (250nM)	0.21 ± 0.02	5.5 ± 0.4	0.19 ± 0.01	300 ± 90
+ CP 55940 (100nM)	0.24 ± 0.03	6.5 ± 0.7	0.11 ± 0.01	630 ± 340
+ CGS 21680 + CP 55940	0.15 ± 0.01	0.8 ± 0.3	0.22 ± 0.03	71 ± 16
<i>Acute L-DOPA rats (Lesioned Side)</i>				
Not treated	0.26 ± 0.01	1.1 ± 0.1	0.27 ± 0.04	100 ± 30
+ CGS 21680 (250nM)	0.30 ± 0.02	2.7 ± 0.4	0.21 ± 0.02	330 ± 90
+ CP 55940 (100nM)	0.31 ± 0.02	3.9 ± 0.8	0.20 ± 0.01	580 ± 170
+ CGS 21680 + CP 55940	0.28 ± 0.01	2.5 ± 1.3	0.22 ± 0.03	270 ± 70
<i>Chronic L-DOPA rats (Unlesioned Side)</i>				
Not treated	0.20 ± 0.01	4.2 ± 0.3	0.12 ± 0.01	300 ± 60
+ CGS 21680 (250nM)	0.13 ± 0.04	3.9 ± 0.6	0.14 ± 0.01	270 ± 30
+ CP 55940 (100nM)	0.23 ± 0.02	6.5 ± 0.1	0.11 ± 0.01	690 ± 70
+ CGS 21680 + CP 55940	0.21 ± 0.01	6.2 ± 0.9	0.13 ± 0.01	500 ± 260
<i>Chronic L-DOPA rats (Lesioned Side)</i>				
Not treated	0.18 ± 0.01	1.4 ± 0.3	0.23 ± 0.03	120 ± 30
+ CGS 21680 (250nM)	0.19 ± 0.01	2.6 ± 0.6	0.21 ± 0.04	1000 ± 700
+ CP 55940 (100nM)	0.22 ± 0.03	6.6 ± 1.3	0.22 ± 0.03	740 ± 210
+ CGS 21680 + CP 55940	0.16 ± 0.02	6.2 ± 1.4	0.16 ± 0.02	530 ± 100

Els valors representats són la mitjana ± SEM de 3 experiments realitzats amb un total de 30 rates de cada condició.

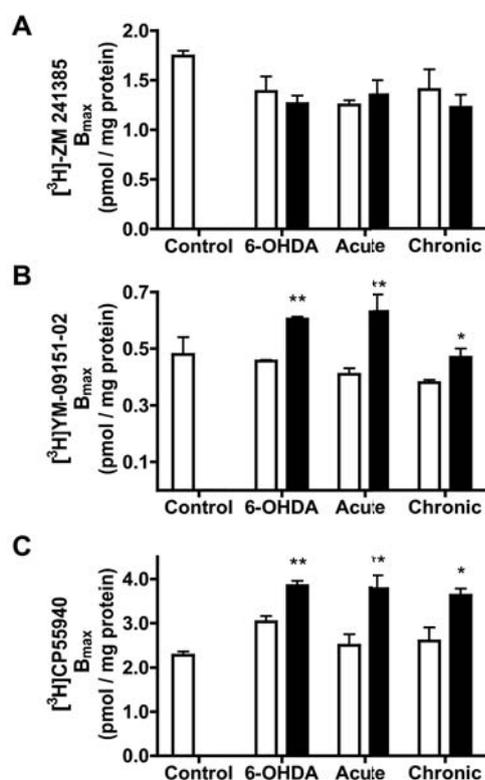


Figura 6. Expressió dels receptors A_{2A}, CB₁ i D₂ a l'estriat de rates model de PD. La unió màxima s'ha calculat a partir d'experiments de competició en membranes (0.3 mg de proteïna/ml) hemiestriatals del costat lesionat (negre) o no lesionat (blanc) rates lesionades amb 6-OHDA. S'ha emprat l'antagonista del receptor A_{2A} [³H]ZM 241385 (4 nM; A), l'antagonista del receptor D₂ [³H]YM-09151-02 (0.5 nM; B) o l'agonista del receptor CB₁ [³H]CP 55940 (6 nM; C) *versus* una concentració 50 μM dels mateixos lligands sense marcar radioactivament. Per al càlcul s'han considerat les següents constants d'afinitat establertes a la Fig. 3. Els valors són la mitjana ± SEM de triplicats. La significança estadística s'ha calculat amb un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test post-hoc de comparació múltiple de Dunnet (*p<0,05; **p<0,001, respecte al costat no lesionat corresponent).

6.4 Discussió

Els concepte d'heteròmer de receptors, en què receptors de la mateixa o diferents famílies gèniques es poden combinar entre ells per a generar característiques bioquímiques i funcionals noves i específiques, està cada cop més acceptat per als GPCR i constitueix una àrea emergent en el camp de la senyalització per receptors (Ferré et al., 2009). Gràcies a l'heteromerització, els receptors esdevenen entitats funcionals úniques i es converteixen en noves dianes potencialment terapèutiques (Ferré et al., 2007; 2009; Pin et al., 2007; Dalrymple et al., 2008; Casadó et al., 2009). Ja existeix una llarga llista d'heteròmers descrits per a dos receptors diferents (Pin et al., 2007; Dalrymple

et al., 2008). Recentment, a més, s'han obtingut evidències de l'existència de multímers de receptors, és a dir, heteròmers en què hi ha més de dos receptors diferents. Un exemple són els heteròmers entre receptors A_{2A} d'adenosina, CB_1 de cannabinoides i D_2 de dopamina, que s'han observat tant en cèl·lules transfectades com a l'estriat (Carriba et al., 2008; Navarro et al., 2010). S'ha hipotetitzat que els heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 es trobin principalment en un subtipus de neurones estriatals, les GABAèrgiques encefalinèrgiques, on els tres receptors es troben altament coexpressats i exerceixen un control significatiu de la funció dels ganglis basals (Ferré et al., 2009). En estudis que utilitzen receptors mutants que alteren l'estructura quaternària dels heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 s'ha demostrat que tant l'activació dels receptors A_{2A} d'adenosina com dels CB_1 de cannabinoides modulen la funció del receptor D_2 a través de l'heteròmer (Navarro et al., 2010). Aquesta habilitat per a modular la senyalització del receptor D_2 en neurones estriatals és molt rellevant en la malaltia de Parkinson. De totes maneres, encara queden moltes qüestions sense resoldre respecte al paper dels heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 . Una d'aquestes qüestions és: què passa amb els heteromultímers en una situació patològica, no es modifiquen, s'altera la seva expressió o s'altera la funció? Prèviament, el nostre grup ha mostrat com altres heteròmers es poden regular sota condicions fisiològiques, però fins al dia d'avui no hi ha hagut publicacions de canvis en els heteròmers deguts a una patologia. En aquest capítol, emprant tècniques directes i indirectes i en dos models animals diferents de PD, presentem la primera prova que coneixem de que hi ha canvis profunds en els heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 en animals discinètics. D'aquest estudi se'n deriven diverses observacions importants. En primer lloc, els heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 es detecten tant en cervells de rata com de primats. En segon lloc, a l'estriat dels macacos, s'ha observat l'expressió dels heteròmers al caudat i no al putamen. En tercer lloc, l'expressió d'aquests heteròmers a l'estriat també s'observa en rates lesionades amb 6-OHDOPA i en macacos lesionats amb MPTP. Finalment, el tractament amb L-DOPA causa una pèrdua de l'expressió d'heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 tant en rates com en primats lesionats, indicant la pèrdua d'heteromerització en animals discinètics. L'expressió dels heterotrímers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 es va demostrar directament en cèl·lules transfectades per tècniques de transferència d'energia per ressonància i indirectament a l'estriat de ratolí per experiments de senyalització (Navarro et al., 2010). De totes maneres, la identificació directa dels heteròmers en un teixit sovint és un repte. Aquí, utilitzant els assajos de lligació per proximitat (PLA) s'ha demostrat l'expressió dels heterotrímers a l'estriat de macacos. Encara que

la tècnica de PLA està limitada a detectar interaccions entre parelles de receptors, ha estat possible analitzar i quantificar totes les combinacions diferents del complex. Aquestes dades, acoblades a les dades d'unió de lligands, ens han permès assumir raonablement l'expressió dels heterotrímiers. De manera sorprenent, en els experiments amb macacos, hem observat diferències en l'expressió dels heteròmers al putamen respecte al caudat. La pèrdua d'expressió de l'heteròmer de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 al putamen no està associada a un descens en l'expressió dels receptors A_{2A} , CB_1 o D_2 en el putamen respecte al caudat, encara que en estudis de PET en humans es va veure que els receptors A_{2A} estaven asimètricament sotaexpressats al putamen i no al cap del nucli caudat (Mishina et al., 2011). El motiu exacte de la pèrdua dels heteròmers al putamen es desconeix però aquest fet pot reflectir diferències bioquímiques en aquestes dues regions estriatals que poden ser la base que expliqui algunes diferències funcionals observades, tal com diferències a la sensibilitat d'aquestes dues regions a la degeneració (Nandhagopal et al., 2009; Blesa et al., 2012) o a tasques d'aprenentatge (Mattfeld et al., 2012). De fet, utilitzant imatges de ressonància magnètica funcional d'alta resolució (fMRI) durant tasques d'aprenentatge associatiu probabilístic basades en la recompensa o el càstig, s'ha observat especialització funcional dintre l'estriat (el putamen ventral respecte del caudat dorsal). De totes maneres, es requeriran estudis més exhaustius per entendre plenament aquestes observacions.

El fet que els heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 s'expressin en primats o rates control i també en animals parkinsonians no tractats amb L-DOPA, suggereix que aquests complexos poden constituir bones dianes terapèutiques en els primers estadis de la malaltia. S'ha suggerit que els antagonistes del receptor A_{2A} podrien potenciar els efectes mitjançats pel receptor D_2 reduïnt la inhibició tònica que provocaria l'adenosina als receptors D_2 en l'heteròmer A_{2A} - D_2 i per tant, facilitarien l'activació motora (Schwarschild et al., 2006; Ramlackhansingh et al., 2011). A més, l'heterotrímer A_{2A} - CB_1 - D_2 està associat a canvis qualitius significatius en la senyalització dels receptors per la via de les MAPK i sembla que tant els agonistes dels receptors A_{2A} com els dels CB_1 modulen negativament la unió dels lligands al receptors D_2 a l'heteròmer (Navarro et al., 2010; Higley et al., 2010; Marcelino et al., 2008). Per tant, els tractament amb antagonistes tant dels receptors A_{2A} com CB_1 pot facilitar l'activació motora compensant la pèrdua de dopamina i per tant ser beneficiós per als dèficits motors parkinsonians.

En aquest estudi, s'ha demostrat que, efectivament, tant els agonistes del receptor A_{2A} com del CB_1 fan disminuir l'afinitat dels receptors D_2 per la dopamina, però, curiosament quan ambdós receptors són coactivats aquest efecte es veu revertit. Aquests resultats suggereixen que l'adenosina i els cannabinoides actuen de manera coordinada per a regular la transmissió dopaminèrgica. A més, els resultats també posen de manifest que la regulació del receptor D_2 de dopamina per adenosina o cannabinoides només apareix en determinades parts de l'estriat, ja que s'observen diferències en l'expressió de l'heteròmer en diferents regions de l'estriat de primats. Els resultats d'aquest capítol també suggereixen que l'efecte de l'activació dels receptors A_{2A} o CB_1 sobre la funció dels receptors D_2 només es donaria en pacients que no hagin estat prèviament tractats amb L-DOPA. Què passa amb els animals tractats amb L-DOPA? Els resultats presentats aquí mostren que tant els macacos com les rates tractades amb L-DOPA perden l'expressió dels heteròmers i que la comunicació entre receptors a nivell d'unió de lligands també desapareix. Una explicació possible seria que el complex es perdés simplement degut a una pèrdua de l'expressió dels receptors. Però les dades d'unió presentades en aquest treball demostren que la presència dels receptors és relativament constant en totes les mostres analitzades, i en proporcions que serien més que suficients per permetre la formació de complexos. Una altra possibilitat seria que la pèrdua del complex en presència de L-DOPA podria ser deguda a una pèrdua dels receptors de la membrana plasmàtica. De fet, estudis de PET han mostrat que el pic de discinèsia està associat a nivells anormalment alts de dopamina sinàptica al caudat-putamen de pacients tractats amb L-DOPA i també en rates lesionades amb 6-OHDA discinètiques comparades amb d'altres no discinètiques. Això suggereix que els nivells extracel·lulars de dopamina juguen un rol important en la inducció de discinèsia (Carta i Bezard, 2011) i probablement puguin induir internalització dels receptors. Amb els nostres resultats no es pot descartar el fenomen d'internalització dels receptors ja que s'han emprat membranes totals cel·lulars. Fins i tot si els receptors fossin internalitzats, la pèrdua dels heteròmers és evident. En aquests moments, és difícil saber quin és el mecanisme molecular exacte que duu a la pèrdua d'heteromerització, però els resultats amb rates suggereixen que està més associada al tractament amb L-DOPA que a l'aparició de la discinèsia.

El conjunt de resultats que es presenten en aquest estudi permet extreure diverses conclusions. En primer lloc, els heterotrímers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 s'expressen al caudat de macacos i a l'estriat de rates tant d'animals no lesionats

com d'animals lesionats, i a través d'aquests heteròmers els agonistes dels receptors A_{2A} i CB_1 modulen negativament l'afinitat de la dopamina pels receptors D_2 de manera coordinada. Aquests resultats suggereixen que els heterotrímers A_{2A} - CB_1 - D_2 poden servir com a dianes terapèutiques en els primers estadis de la malaltia de Parkinson. En segon lloc, hi ha diferents característiques bioquímiques entre els nuclis caudat i putamen de l'estriat de primats degudes a diferències en l'expressió d'heteròmers. Finalment, considerant que els mecanismes que porten al control de l'heteromerització entre receptors encara no estan del tot elucidats, els resultats presentats aquí signifiquen un dels primers exemples d'heteròmers de receptors que es poden modificar per una condició patològica, la discinèsia induïda per L-DOPA, que pot disrompre l'heteromerització dels receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 . Aquestes troballes obren noves perspectives en la regulació de les vies dopaminèrgiques i donen peu a una reavaluació dels antagonistes dels receptors A_{2A} i CB_1 com a tractaments prometedors contra la discinèsia induïda per L-DOPA.

BIBLIOGRAFIA DEL CAPÍTOL 6

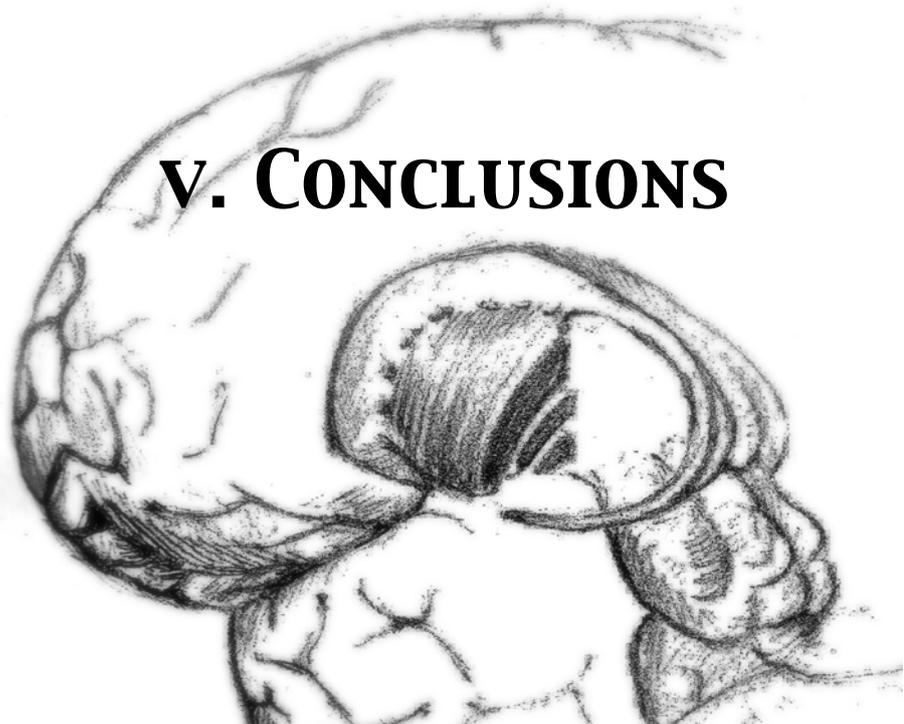
- [1] Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989;12:366-75.
- [2] Bezard E, Dovero S, Prunier C, Ravenscroft P, Chalon S, Guilloteau D, et al. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2001;21:6853-61.
- [3] Blesa J, Pifl C, Sanchez-Gonzalez MA, Juri C, Garcia-Cabezas MA, Adanez R, et al. The nigrostriatal system in the presymptomatic and symptomatic stages in the MPTP monkey model: A PET, histological and biochemical study. *Neurobiol Dis* 2012.
- [4] Callen L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortes A, Mallol J, et al. Cannabinoid receptors CB_1 and CB_2 form functional heteromers in the brain. *J Biol Chem* 2012.
- [5] Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. Adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 2003;278:46741-9.
- [6] Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 2008;5:727-33.
- [7] Carta M, Bezard E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience* 2011;198:245-51.
- [8] Casado V, Canti C, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Solubilization of A_1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J Neurosci Res* 1990;26:461-73.
- [9] Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, et al. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled

- monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 2007;116:343-54.
- [10] Casado V, Ferrada C, Bonaventura J, Gracia E, Mallol J, Canela EI, et al. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem Pharmacol* 2009;78:1456-63.
- [11] Cenci MA. L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13 Suppl 3:S263-7.
- [12] Dalrymple MB, Pflieger KD, Eidne KA. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther* 2008;118:359-71.
- [13] DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 1990;13:281-5.
- [14] Encarnacion EV, Hauser RA. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: etiology, impact on quality of life, and treatments. *Eur Neurol* 2008;60:57-66.
- [15] Ferre S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* 2009;5:131-4.
- [16] Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2004;10:265-71.
- [17] Ferre S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* 2007;30:440-6.
- [18] Ferre S, Fuxe K. Dopamine denervation leads to an increase in the intramembrane interaction between adenosine A2 and dopamine D2 receptors in the neostriatum. *Brain Res* 1992;594:124-30.
- [19] Ferre S, Goldberg SR, Lluís C, Franco R. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology* 2009;56 Suppl 1:226-34.
- [20] Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. 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* 1991;88:7238-41.
- [21] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, et al. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 2006;69:1905-12.
- [22] Fuxe K, Ferre S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav* 2007;92:210-7.
- [23] Garcia-Arencibia M, Garcia C, Fernandez-Ruiz J. Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009;8:432-9.
- [24] Gottwald MD, Aminoff MJ. Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2011;69:919-27.
- [25] Higley MJ, Sabatini BL. Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci* 2010;13:958-66.
- [26] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091-7.
- [27] Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 2010;466:622-6.
- [28] Kurlan R, Kim MH, Gash DM. Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov Disord* 1991;6:111-8.
- [29] Lanciego JL, Rodriguez-Oroz MC, Blesa FJ, Alvarez-Erviti L, Guridi J, Barroso-Chinea P, et al. Lesion of the centromedian thalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Mov Disord* 2008;23:708-15.
- [30] Lanciego JL, Vazquez A. The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections. *Brain Struct Funct* 2012;217:613-66.
- [31] Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos ML, Zeng BY, Jenner P, Ramos JA, et al.

- Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 2001;14:1827-32.
- [32] Lewis SJ, Caldwell MA, Barker RA. Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Rev Mol Med* 2003;5:1-20.
- [33] Marcellino D, Carriba P, Filip M, Borgkvist A, Frankowska M, Bellido I, et al. Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 2008;54:815-23.
- [34] Mattfeld AT, Gluck MA, Stark CE. Functional specialization within the striatum along both the dorsal/ventral and anterior/posterior axes during associative learning via reward and punishment. *Learn Mem* 2011;18:703-11.
- [35] Mishina M, Ishiwata K, Naganawa M, Kimura Y, Kitamura S, Suzuki M, et al. Adenosine A(2A) receptors measured with [C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 2011;6:e17338.
- [36] Muller CE, Ferre S. Blocking striatal adenosine A2A receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2007;2:1-21.
- [37] Nandhagopal R, Kuramoto L, Schulzer M, Mak E, Cragg J, Lee CS, et al. Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. *Brain* 2009;132:2970-9.
- [38] Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, et al. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 2010;285:27346-59.
- [39] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23 Suppl 3:S548-59.
- [40] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2000;23:S8-19.
- [41] Pellegrino LJ, Pellegrino, A.S., Cushman A.J., editor. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. New York, NY: Plenum Press, 1979.
- [42] Pin JP, Neubig R, Bouvier M, Devi L, Filizola M, Javitch JA, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* 2007;59:5-13.
- [43] Pinna A. Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1619-31.
- [44] Pinna A, di Chiara G, Wardas J, Morelli M. Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur J Neurosci* 1996;8:1176-81.
- [45] Pisani A, Fezza F, Galati S, Battista N, Napolitano S, Finazzi-Agro A, et al. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann Neurol* 2005;57:777-9.
- [46] Pollack AE, Fink JS. Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res* 1996;743:124-30.
- [47] Ramlackhansingh AF, Bose SK, Ahmed I, Turkheimer FE, Pavese N, Brooks DJ. Adenosine 2A receptor availability in dyskinetic and nondyskinetic patients with Parkinson disease. *Neurology* 2011;76:1811-6.
- [48] Romero J, Berrendero F, Perez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernandez-Ruiz JJ, et al. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 2000;66:485-94.
- [49] Sagredo O, Garcia-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernandez-Ruiz J. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol* 2007;36:82-91.
- [50] Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007;83:277-92.

- [51] Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2006;29:647-54.
- [52] Schwarzschild MA, Chen JF, Ascherio A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. *Neurology* 2002;58:1154-60.
- [53] Soderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, et al. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* 2008;45:227-32.
- [54] Trifilieff P, Rives ML, Urizar E, Piskorowski RA, Vishwasrao HD, Castrillon J, et al. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 2011;51:111-8.

V. CONCLUSIONS



V. CONCLUSIONS

Les conclusions obtingudes a partir dels resultats del **Capítol 1**, que es corresponen amb l'Objectiu 1 d'aquesta Tesi, han estat:

- El mètode d'anàlisi d'imatges obtingudes per microscòpia confocal de disc giratori a temps real, representa una eina valuosa per determinar de la dinàmica dels GPCR de la membrana cel·lular.
- L'activació per agonista dels receptors de dopamina D₂ provoca, a curt termini, un increment de la mobilitat dels receptors de la membrana. A llarg termini, provoca la internalització dels receptors per un procés dependent de GRK2.
- El moviment lateral dels receptors de dopamina D₂ a la membrana no està relacionat amb el procés d'internalització dels receptors.

Dels resultats del **Capítol 2** s'han obtingut les següents conclusions, que es corresponen amb l'Objectiu 2 d'aquesta Tesi:

- El *two-state dimer receptor model* és un model vàlid per interpretar dades d'unió de lligands a receptors homodimèrics i pot explicar resultats que no serien coherents segons els models clàssics que consideren els receptors com a unitats monomèriques.
- Del *two-state dimer receptor model* se'n poden obtenir les constants macroscòpiques dels equilibris de dissociació de lligands per a ambdós monòmers en els homodímers, així com paràmetres que permeten descriure fenòmens com cooperativitat i modulació entre radiolligand i competidor en experiments de competició.

- La capacitat dels receptors de formar homòmers ha de ser tinguda en compte per a la caracterització farmacològica acurada de nous fàrmacs dirigits a aquest receptors.

Dels resultats presentats al **Capítol 3**, que corresponen a l'Objectiu 3 d'aquesta Tesi, s'han obtingut les següents conclusions:

- La unió de l'heterocicle indolo[2,3-*a*]quinolizidina amb diversos tripèptids mitjançant química combinatòria ha permès la selecció del compost 9aAhx{1,3,3} que mostra afinitat pels receptors D₂ de dopamina i no pels receptors D₁ de dopamina
- El compost 9aAhx{1,3,3} s'uneix al centre ortostèric dels receptors D₂ de dopamina i actua com un agonista parcial.

Les conclusions obtingudes a partir dels resultats del **Capítol 4**, que es corresponen amb l'Objectiu 4 d'aquesta Tesi, han estat :

- Els receptors σ_1 formen heteròmers amb els receptors D₂ de dopamina però no amb els altres membres de la família de receptors D_{2-like}, D₃ i D₄.
- Aquests heteròmers de receptors σ_1 -D₂ estan constituïts, com a mínim, per la interacció dels homodímers dels seus components i s'expressen tant en cèl·lules transfectades com a l'estriat de ratolí.
- La unió de cocaïna al receptor σ_1 indueix canvis estructurals i funcionals als heteròmers de receptors σ_1 -D₂. La cocaïna, interaccionant amb σ_1 , actua com un agonista de l'heteròmer σ_1 -D₂ a nivell d'activació de les MAPK. Simultàniament, la cocaïna inhibeix la senyalització induïda pels agonistes del receptor D₂ en cèl·lules en cultiu i en l'estriat de ratolí. Aquests fets podrien ocasionar una desregulació del balanç entre les vies directa i indirecta de l'estriat.

Dels resultats presentats al **Capítol 5**, que corresponen a l'Objectiu 5 d'aquesta Tesi, s'han obtingut les següents conclusions:

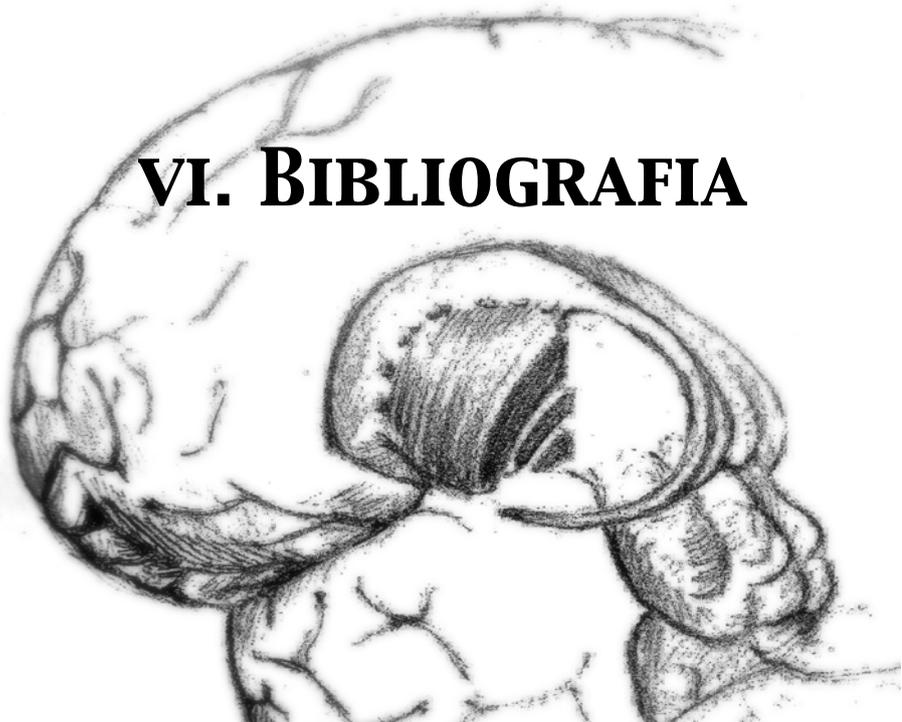
- En cultius cel·lulars, la unió d'agonistes i antagonistes al receptor A_{2A} d'adenosina disminueix l'afinitat tant d'agonistes com d'antagonistes pel receptor D_2 de dopamina.
- Aquestes interaccions negatives entre lligands són conseqüència de les interaccions al·lostèriques entre ambdós receptors en l'heteròmer $A_{2A}-D_2$ i constitueixen propietats bioquímiques característiques d'aquest heteròmer.
- En teixit *ex vivo*, fent servir aquestes interaccions al·lostèriques com a "empremta dactilar" de l'heteròmer, s'ha demostrat l'expressió de l'heteròmer de receptors $A_{2A}-D_2$ a l'estriat humà.
- El fet que els antagonistes dels receptors A_{2A} puguin modular la farmacologia dels receptors D_2 és rellevant per entendre el paper dels receptors A_{2A} per contrarestar els efectes dels receptors D_2 en alteracions patològiques com Parkinson o en diagnòstic per PET.

Les conclusions obtingudes dels resultats del **Capítol 6**, en el marc de l'Objectiu 6 d'aquesta Tesi, són:

- Els receptors d'adenosina A_{2A} , de cannabinoides CB_1 i de dopamina D_2 formen heteròmers en el nucli caudat de *Macaca fascicularis* no lesionats o lesionats amb MPTP però no en el putamen, on aquests receptors s'expressen en nivells similars o superiors.
- La unió de la dopamina al receptor D_2 es modula negativament quan els receptors A_{2A} o els receptors CB_1 s'activen individualment però no quan es co-activen. Aquesta propietat bioquímica, que únicament s'observa al caudat, correlaciona amb l'expressió dels heteròmers en el caudat però no en el putamen dels macacos no lesionats i lesionats, pel que constitueix una característica de l'heteròmer.
- La interacció negativa a nivell d'unió de lligands s'observa també a l'estriat de rates no lesionades o lesionades amb 6-hidroxidopamina, indicant l'expressió d'heteròmers $A_{2A}-CB_1-D_2$ a l'estriat d'aquests animals.

- L'aparició de discinèsia en els macacos o en les rates per tractament amb L-DOPA comporta la pèrdua de l'expressió dels heteròmers A_{2A} - CB_1 - D_2 al caudat de macacos i a l'estriat de rates sense variacions significatives en l'expressió dels receptors.
- Els heteròmers de receptors A_{2A} - CB_1 - D_2 constitueixen una diana terapèutica en la malaltia de Parkinson i la seva disrupció correlaciona amb l'aparició de discinèsia associada al tractament amb L-DOPA.

VI. BIBLIOGRAFIA



VI. BIBLIOGRAFIA

- [1] AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 2000;407:94-8.
- [2] Abi-Dargham A. Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004;7 Suppl 1:S1-5.
- [3] Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:415-31.
- [4] Agnati LF, Ferre S, Lluís C, Franco R, Fuxe K. Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol Rev* 2003;55:509-50.
- [5] Agnati LF, Franzen O, Ferre S, Leo G, Franco R, Fuxe K. Possible role of intramembrane receptor-receptor interactions in memory and learning via formation of long-lived heteromeric complexes: focus on motor learning in the basal ganglia. *J Neural Transm Suppl* 2003:1-28.
- [6] Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 1990;13:266-71.
- [7] Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* 1999;58:315-48.
- [8] Andersson M, Usiello A, Borgkvist A, Pozzi L, Dominguez C, Fienberg AA, et al. 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* 2005;25:8432-8.
- [9] Antle MC, Steen NM, Mistleberger RE. Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster. *Neuroreport* 2001;12:2901-5.
- [10] Bai M, Trivedi S, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 1998;273:23605-10.
- [11] Baldwin JM. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:180-90.
- [12] Bamford NS, Zhang H, Schmitz Y, Wu NP, Cepeda C, Levine MS, et al. Heterosynaptic dopamine neurotransmission selects sets of corticostriatal terminals. *Neuron* 2004;42:653-63.
- [13] Baneres JL, Parelo J. 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* 2003;329:815-29.
- [14] Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, Favit A, Bibbiani F, Gillespie M, et al. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 2003;61:293-6.
- [15] Baraldi PG, Pavani MG, Leung E, Moorman AR, Varani K, Vincenzi F, et al. 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* 2006;16:1402-4.
- [16] Beltramo M. Cannabinoid type 2 receptor as a target for chronic - pain. *Mini Rev Med Chem* 2009;9:11-25.
- [17] Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997;277:1094-7.
- [18] Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem* 1997;272:30603-6.
- [19] Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 2000;25:515-32.
- [20] Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 1983;42:3136-42.
- [21] Berrendero F, Mendizabal V, Murtra P, Kieffer BL, Maldonado R. Cannabinoid receptor and WIN 55 212-2-stimulated [³⁵S]-GTPgammaS binding in the brain of mu-, delta- and kappa-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci* 2003;18:2197-202.
- [22] Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 2003;163:463-8.
- [23] Bjorness TE, Greene RW. Adenosine and sleep. *Curr Neuropharmacol* 2009;7:238-45.
- [24] Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res* 2006;326:553-72.
- [25] Bockaert J, Fagni L, Dumuis A, Marin P. GPCR interacting proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 2004;103:203-21.
- [26] Bohm SK, Grady EF, Bunnnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 1997;322 (Pt 1):1-18.
- [27] Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:274-86.
- [28] Bouvier M, Moffett S, Loisel TP, Mouillac B, Hebert T, Chidiac P. Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochem Soc Trans* 1995;23:116-20.
- [29] Brown RM, Short JL. Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction. *J Pharm Pharmacol* 2008;60:1409-30.
- [30] Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [³H]NECA in rat striatal membranes. *Mol Pharmacol* 1986;29:331-46.
- [31] Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1139:450-7.

- [32] Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:131-7.
- [33] Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, et al. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988;336:783-7.
- [34] Burgueno J, Blake DJ, Benson MA, Tinsley CL, Esapa CT, Canela EI, et al. The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin. *J Biol Chem* 2003;278:37545-52.
- [35] Burnstock G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 2009;15:1717-35.
- [36] Calabresi P, De Murtas M, Bernardi G. The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence. *Neuroscience* 1997;78:39-60.
- [37] Canals M, Angulo E, Casado V, Canela EI, Mallol J, Vinals F, et al. Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures. *J Neurochem* 2005;92:337-48.
- [38] Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem* 2003;278:46741-9.
- [39] Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:237-60.
- [40] Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 2008;5:727-33.
- [41] Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:2249-59.
- [42] Casado V, Canti C, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R. Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J Neurosci Res* 1990;26:461-73.
- [43] Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, et al. Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 2007;116:343-54.
- [44] Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavon N, et al. Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci* 2003;23:8506-12.
- [45] Choi WJ, Lee HW, Kim HO, Chinn M, Gao ZG, Patel A, et al. Design and synthesis of N(6)-substituted-4'-thioadenosine-5'-uronamides as potent and selective human A(3) adenosine receptor agonists. *Bioorg Med Chem* 2009;17:8003-11.
- [46] Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcellino D, Goldberg SR, et al. 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* 2004;76:5354-63.
- [47] Ciruela F, Canela L, Burgueno J, Soriguera A, Cabello N, Canela EI, et al.

- Heptaspanning membrane receptors and cytoskeletal/scaffolding proteins: focus on adenosine, dopamine, and metabotropic glutamate receptor function. *J Mol Neurosci* 2005;26:277-92.
- [48] Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M, et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 2006;26:2080-7.
- [49] Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:281-307.
- [50] Colquhoun D. The relationship between classical and cooperative models for drug action. In: Rang HP, editor. *A Symposium on Drug Receptors*. Baltimore: University Park Press, 1973. p. 149-82.
- [51] Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:205-37.
- [52] Costa T, Herz A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7321-5.
- [53] Cristalli G, Muller CE, Volpini R. Recent developments in adenosine A2A receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2009:59-98.
- [54] Cunha RA, Ribeiro JA. Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* 2000;39:1156-67.
- [55] Cvejic S, Devi LA. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 1997;272:26959-64.
- [56] Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, et al. Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273:685-8.
- [57] Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, et al. The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 1989;8:4025-34.
- [58] Dale M. Sistema nervioso central: Otros neurotransmisores y neuromoduladores: Dopamina. *Farmacología*: Hardcourt, 2000.
- [59] Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin JP, Baneres JL. Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J* 2006;25:5693-702.
- [60] De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1980;255:7108-17.
- [61] Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 1990;347:72-6.
- [62] DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000;148:1267-81.
- [63] Del Castillo J, Katz B. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;146:369-81.
- [64] Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988;34:605-13.
- [65] Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-9.

- [66] Devi LA. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:532-7.
- [67] Di Carlo G, Izzo AA. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:39-49.
- [68] Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* 2002;137:75-114.
- [69] Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:771-84.
- [70] Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994;372:686-91.
- [71] Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:31-55.
- [72] Elsworth JD, Roth RH. Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997;144:4-9.
- [73] Ferre S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* 2009;5:131-4.
- [74] Ferre S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* 2007;30:440-6.
- [75] Ferre S, Franco R. Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:1-5.
- [76] Ferre S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1997;20:482-7.
- [77] Ferre S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 1992;51:501-12.
- [78] Ferre S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, et al. Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11940-5.
- [79] Ferre S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. 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* 1991;88:7238-41.
- [80] Filipek S, Krzysko KA, Fotiadis D, Liang Y, Saperstein DA, Engel A, et al. A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:628-38.
- [81] Fioramonti J, Bueno L. Role of cannabinoid receptors in the control of gastrointestinal motility and perception. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2:385-97.
- [82] Flórez J, Pazos A. Neurotransmisión en el sistema nervioso central. . *Farmacología humana: Masson*, 2003. p. 435-60.
- [83] Flower DR. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999;1422:207-34.
- [84] Fontinha BM, Delgado-García JM, Madronal N, Ribeiro JA, Sebastiao AM, Gruart A. Adenosine A(2A) receptor modulation of hippocampal CA3-CA1 synapse plasticity during associative learning in behaving mice. *Neuropsychopharmacology* 2009;34:1865-74.

- [85] Förster T. *Ann Phys* 1948;2.
- [86] Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 2003;421:127-8.
- [87] Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett* 2004;564:281-8.
- [88] Franco R, Canals M, Marcellino D, Ferre S, Agnati L, Mallol J, et al. Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem Sci* 2003;28:238-43.
- [89] Franco R, Casado V, Ciruela F, Mallol J, Lluís C, Canela EI. The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A1 adenosine receptors. *Biochemistry* 1996;35:3007-15.
- [90] Franco R, Casado V, Cortes A, Mallol J, Ciruela F, Ferre S, et al. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S90-8.
- [91] Franco R, Casado V, Cortes A, Perez-Capote K, Mallol J, Canela E, et al. Novel pharmacological targets based on receptor heteromers. *Brain Res Rev* 2008;58:475-82.
- [92] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, et al. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 2006;69:1905-12.
- [93] Franco R, Casado V, Mallol J, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, et al. Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. *Trends Biochem Sci* 2005;30:360-6.
- [94] Franco R, Ferre S, Agnati L, Torvinen M, Gines S, Hillion J, et al. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:S50-9.
- [95] Franco R, Lluís C, Canela EI, Mallol J, Agnati L, Casado V, et al. Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins. *J Neural Transm* 2007;114:93-104.
- [96] Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998;161:27-42.
- [97] Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994;46:143-56.
- [98] Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.
- [99] Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:364-74.
- [100] Fredholm BB, Svenningsson P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* 2003;61:S5-9.
- [101] Fuxe K, Ungerstedt U. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med Biol* 1974;52:48-54.
- [102] Gandia J, Galino J, Amaral OB, Soriano A, Lluís C, Franco R, et al. Detection of

- higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett* 2008;582:2979-84.
- [103] Gandia J, Lluís C, Ferré S, Franco R, Ciruela F. Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays* 2008;30:82-9.
- [104] Gehl C, Waadt R, Kudla J, Mendel RR, Hansch R. New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant* 2009;2:1051-8.
- [105] George SR, O'Dowd BF, Lee SP. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:808-20.
- [106] Gerfen CR. *Basal Ganglia*: Elsevier Academic Press, 2004.
- [107] Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990;250:1429-32.
- [108] Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8606-11.
- [109] Gingrich JA, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993;16:299-321.
- [110] Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 1989;342:923-6.
- [111] Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 1999;2:358-63.
- [112] Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 2000;20:RC110.
- [113] Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, et al. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 2006;1071:10-23.
- [114] Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF, et al. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 2008;452:93-7.
- [115] Goudet C, Kniazeff J, Hlavackova V, Malhaire F, Maurel D, Acher F, et al. Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators. *J Biol Chem* 2005;280:24380-5.
- [116] Gouldson PR, Higgs C, Smith RE, Dean MK, Gkoutos GV, Reynolds CA. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:S60-77.
- [117] Gracia E, Perez-Capote K, Moreno E, Barkesova J, Mallol J, Lluís C, et al. A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem J* 2011;435:701-9.
- [118] Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 2001;294:1024-30.
- [119] Gudermann T, Schöneberg T, Schultz G. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1997;20:399-427.
- [120] Hall DA. Modeling the functional effects of allosteric modulators at

- pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. *Mol Pharmacol* 2000;58:1412-23.
- [121] Hamm HE. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 1998;273:669-72.
- [122] Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3662-5.
- [123] Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 1989;264:12657-65.
- [124] Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, et al. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 1996;271:16384-92.
- [125] Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Aswad DW, Greengard P. 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* 1984;4:99-110.
- [126] Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res* 1991;547:267-74.
- [127] Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, Maloteaux JM. Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons. *Neurochem Int* 1997;31:291-9.
- [128] Herrera C, Casado V, Ciruela F, Schofield P, Mallol J, Lluís C, et al. Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol Pharmacol* 2001;59:127-34.
- [129] Herrick-Davis K, Grinde E, Mazurkiewicz JE. Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* 2004;43:13963-71.
- [130] Herrick-Davis K, Weaver BA, Grinde E, Mazurkiewicz JE. Serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum: real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2006;281:27109-16.
- [131] Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, Hoflack J. Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 1991;40:8-15.
- [132] Hiley CR. Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:267-76.
- [133] Hillard CJ, Edgmond WS, Jarratian A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997;69:631-8.
- [134] Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casado V, Scott R, Terasmaa A, et al. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D₂ receptors. *J Biol Chem* 2002;277:18091-7.
- [135] Hirschberg BT, Schimerlik MI. A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine m₂ muscarinic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1994;269:26127-35.
- [136] Hlavackova V, Goudet C, Kniazeff J, Zikova A, Maurel D, Vol C, et al. Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR.

- EMBO J 2005;24:499-509.
- [137] Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS. Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 1999;96:541-51.
- [138] Howlett AC, Bidaut-Russell M, Devane WA, Melvin LS, Johnson MR, Herkenham M. The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends Neurosci* 1990;13:420-3.
- [139] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 2002;9:789-98.
- [140] Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8400-5.
- [141] Innamorati G, Le Gouill C, Balamotis M, Birnbaumer M. The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2001;276:13096-103.
- [142] Iversen L, Chapman V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:50-5.
- [143] Jarrachian A, Watts VJ, Barker EL. D2 dopamine receptors modulate G α -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:880-6.
- [144] Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF. Adenosine, adenosine A_{2A} antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15:406-13.
- [145] Jockers R, Angers S, Da Silva A, Benaroch P, Strosberg AD, Bouvier M, et al. Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis. *J Biol Chem* 1999;274:28900-8.
- [146] Jog MS, Kubota Y, Connolly CI, Hillegaart V, Graybiel AM. Building neural representations of habits. *Science* 1999;286:1745-9.
- [147] Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9407-12.
- [148] Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 1998;396:674-9.
- [149] Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999;399:697-700.
- [150] Jordan BA, Gomes I, Rios C, Filipovska J, Devi LA. Functional interactions between mu opioid and alpha_{2A}-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 2003;64:1317-24.
- [151] Kamiya T, Saitoh O, Yoshioka K, Nakata H. Oligomerization of adenosine A_{2A} and dopamine D₂ receptors in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:544-9.
- [152] Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, et al. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396:683-7.
- [153] Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol* 2005;67:1697-

- 704.
- [154] Keabian JW, Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979;277:93-6.
- [155] Kempe K, Hsu FF, Bohrer A, Turk J. Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue. *J Biol Chem* 1996;271:17287-95.
- [156] Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 2003;74:486-96.
- [157] Klotz KN, Lohse MJ. The glycoprotein nature of A1 adenosine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;140:406-13.
- [158] Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA, Kornetsky C. Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;68:797-803.
- [159] Kofalvi A, Rodrigues RJ, Ledent C, Mackie K, Vizi ES, Cunha RA, et al. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. *J Neurosci* 2005;25:2874-84.
- [160] Kolakowski LF, Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 1994;2:1-7.
- [161] Koob GF. Hedonic valence, dopamine and motivation. *Mol Psychiatry* 1996;1:186-9.
- [162] Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem* 1997;272:5-8.
- [163] Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:289-319.
- [164] Kull B, Ferre S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, et al. Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1035-45.
- [165] Lawrence DK, Gill EW. The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol* 1975;11:595-602.
- [166] Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999;283:401-4.
- [167] Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, et al. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 2004;279:35671-8.
- [168] Leff P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:89-97.
- [169] Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* 1993;74:409-12.
- [170] Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 1998;273:18677-80.
- [171] Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T. Constitutive activity of receptors

- coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:303-7.
- [172] Limbird LE, Meyts PD, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;64:1160-8.
- [173] Lin R, Karpa K, Kabbani N, Goldman-Rakic P, Levenson R. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5258-63.
- [174] Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 1990;265:3202-11.
- [175] Longordo F, Kopp C, Luthi A. Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function. *Eur J Neurosci* 2009;29:1810-9.
- [176] Lorenzen A, Beukers MW, van der Graaf PH, Lang H, van Muijlwijk-Koezen J, de Groote M, et al. Modulation of agonist responses at the A(1) adenosine receptor by an irreversible antagonist, receptor-G protein uncoupling and by the G protein activation state. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1251-65.
- [177] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, et al. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 1999;283:655-61.
- [178] Maggio R, Vogel Z, Wess J. 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* 1993;90:3103-7.
- [179] Maia L, de Mendonca A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol* 2002;9:377-82.
- [180] Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, et al. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 1996;273:657-9.
- [181] Maldonado R, Rodriguez de Fonseca F. Cannabinoid addiction: behavioral models and neural correlates. *J Neurosci* 2002;22:3326-31.
- [182] Manzoni O, Pujalte D, Williams J, Bockaert J. Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal. *J Neurosci* 1998;18:7996-8002.
- [183] Marcellino D, Ferre S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, et al. Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 2008;283:26016-25.
- [184] Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 2000;27:97-106.
- [185] Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:368-76.
- [186] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-4.
- [187] Mattera R, Pitts BJ, Entman ML, Birnbaumer L. 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* 1985;260:7410-21.
- [188] Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et

- al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90.
- [189] Mercuri NB, Saiardi A, Bonci A, Picetti R, Calabresi P, Bernardi G, et al. Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice. *Neuroscience* 1997;79:323-7.
- [190] Meschler JP, Clarkson FA, Mathews PJ, Howlett AC, Madras BK. D(2), but not D(1) dopamine receptor agonists potentiate cannabinoid-induced sedation in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:952-9.
- [191] Meschler JP, Howlett AC. Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* 2001;40:918-26.
- [192] Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998;78:189-225.
- [193] Moreau JL, Huber G. Central adenosine A(2A) receptors: an overview. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;31:65-82.
- [194] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-5.
- [195] Navarro G, Carriba P, Gandia J, Ciruela F, Casado V, Cortes A, et al. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* 2008;8:1088-97.
- [196] Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, et al. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 2010;285:27346-59.
- [197] Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:119-28.
- [198] Ng GY, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, Seeman P, et al. Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;227:200-4.
- [199] Noble EP, St Jeor ST, Ritchie T, Syndulko K, St Jeor SC, Fitch RJ, et al. D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Med Hypotheses* 1994;42:257-60.
- [200] Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, et al. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 2004;53:208-13.
- [201] Nutt JG. Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology* 1990;40:340-5.
- [202] O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 1993;11:41-52.
- [203] Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23 Suppl 3:S548-59.
- [204] Oka S, Tsuchie A, Tokumura A, Muramatsu M, Suhara Y, Takayama H, et al. Ether-linked analogue of 2-arachidonoylglycerol (noladin ether) was not detected in the brains of various mammalian species. *J Neurochem* 2003;85:1374-81.
- [205] Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization

- of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 2004;279:5298-305.
- [206] Onaran HO, Costa T, Rodbard D. Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol Pharmacol* 1993;43:245-56.
- [207] Orgado JM, Fernandez-Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatry* 2009;21:172-80.
- [208] Packard MG, Knowlton BJ. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 2002;25:563-93.
- [209] Pak Y, O'Dowd BF, Wang JB, George SR. 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* 1999;274:27610-6.
- [210] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000;289:739-45.
- [211] Pani L. Clinical implications of dopamine research in schizophrenia. *Curr Med Res Opin* 2002;18 Suppl 3:s3-7.
- [212] Park B, McPartland JM, Glass M. Cannabis, cannabinoids and reproduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;70:189-97.
- [213] Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997;74:129-80.
- [214] Pflieger KD, Eidne KA. Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem J* 2005;385:625-37.
- [215] Phillis JW, Edstrom JP, Kostopoulos GK, Kirkpatrick JR. Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 1979;57:1289-312.
- [216] Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:873-84.
- [217] Piomelli D, Greengard P. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:367-73.
- [218] Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ. Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol Pharmacol* 1995;47:666-76.
- [219] Popoli P, Blum D, Domenici MR, Burnouf S, Chern Y. A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des* 2008;14:1500-11.
- [220] Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1020-4.
- [221] Prinster SC, Hague C, Hall RA. Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 2005;57:289-98.
- [222] Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992;11:1-20.
- [223] Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* 2002;95:191-202.
- [224] Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, et al. D1-D2

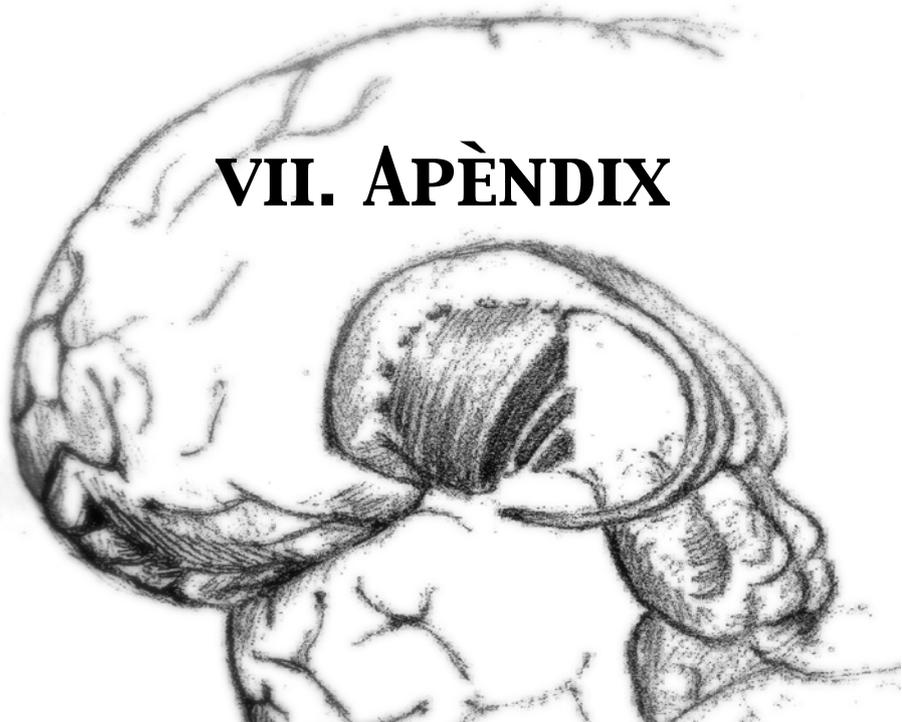
- dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:654-9.
- [225] Reggio R, Pezzola A, Popoli P. The intrastratial injection of an adenosine A₂ receptor antagonist prevents frontal cortex EEG abnormalities in a rat model of Huntington's disease. *Brain Res* 1999;831:315-8.
- [226] Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol* 2002;68:377-92.
- [227] Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect* 2003;16:80-6.
- [228] Rivkees SA, Barbhaiya H, AP IJ. Identification of the adenine binding site of the human A₁ adenosine receptor. *J Biol Chem* 1999;274:3617-21.
- [229] Rivkees SA, Price SL, Zhou FC. 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* 1995;677:193-203.
- [230] Rivkees SA, Zhao Z, Porter G, Turner C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Genet Metab* 2001;74:160-71.
- [231] Robbins MJ, Ciruela F, Rhodes A, McIlhinney RA. Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J Neurochem* 1999;72:2539-47.
- [232] Robbins TW, Everitt BJ. Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 1999;398:567-70.
- [233] Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 2000;275:7862-9.
- [234] Romano C, Miller JK, Hyrc K, Dikranian S, Mennerick S, Takeuchi Y, et al. Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Mol Pharmacol* 2001;59:46-53.
- [235] Romano C, Yang WL, O'Malley KL. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 1996;271:28612-6.
- [236] Romero J, Garcia L, Cebeira M, Zadrozny D, Fernandez-Ruiz JJ, Ramos JA. The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci* 1995;56:2033-40.
- [237] Rosin DL, Robeva A, Woodard RL, Guyenet PG, Linden J. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1998;401:163-86.
- [238] Sakmar TP. Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;59:1-34.
- [239] Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 1993;268:4625-36.
- [240] Samama P, Pei G, Costa T, Cotecchia S, Lefkowitz RJ. Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1994;45:390-4.
- [241] Sanchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, et al. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor. *Cancer Res* 2001;61:5784-9.
- [242] Saura C, Ciruela F, Casado V, Canela EI, Mallol J, Lluís C, et al. Adenosine

- deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J Neurochem* 1996;66:1675-82.
- [243] Sawynok J. Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2007;309-28.
- [244] Scarselli M, Armogida M, Chiacchio S, DeMontis MG, Colzi A, Corsini GU, et al. Reconstitution of functional dopamine D(2s) receptor by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments. *Eur J Pharmacol* 2000;397:291-6.
- [245] Schapira AH, Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B, et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:845-54.
- [246] Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007;83:277-92.
- [247] Schulz A, Grosse R, Schultz G, Gudermann T, Schoneberg T. Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors. *J Biol Chem* 2000;275:2381-9.
- [248] Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2006;29:647-54.
- [249] Schwarzschild MA, Chen JF, Ascherio A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. *Neurology* 2002;58:1154-60.
- [250] Sebastiao AM, de Mendonca A, Moreira T, Ribeiro JA. Activation of synaptic NMDA receptors by action potential-dependent release of transmitter during hypoxia impairs recovery of synaptic transmission on reoxygenation. *J Neurosci* 2001;21:8564-71.
- [251] Selent J, Kaczor AA. Oligomerization of G Protein-Coupled Receptors: Computational Methods. *Curr Med Chem* 2011.
- [252] Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 2007;76:823-47.
- [253] Soria G, Castane A, Berrendero F, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, et al. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci* 2004;20:2203-13.
- [254] Sotnikova TD, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:45-56.
- [255] Spano PF, Govoni S, Trabucchi M. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1978;19:155-65.
- [256] Steeves TD, Fox SH. Neurobiological basis of serotonin-dopamine antagonists in the treatment of Gilles de la Tourette syndrome. *Prog Brain Res* 2008;172:495-513.
- [257] Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997;388:773-8.
- [258] Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* 1978;47:819-46.
- [259] Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, et al. 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:58-64.
- [260] Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, et al. Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on

- chromosome 5. *Nature* 1990;347:80-3.
- [261] Svenningsson P, Le Moine C, Fisone G, Fredholm BB. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 1999;59:355-96.
- [262] Svenningsson P, Lindskog M, Ledent C, Parmentier M, Greengard P, Fredholm BB, et al. 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* 2000;97:1856-60.
- [263] Szabo B, Dorner L, Pfreundtner C, Norenberg W, Starke K. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience* 1998;85:395-403.
- [264] Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 2004;5:30-4.
- [265] Thron CD. On the analysis of pharmacological experiments in terms of an allosteric receptor model. *Mol Pharmacol* 1973;9:1-9.
- [266] Tomassini N, Renaud FL, Roy S, Loh HH. Mu and delta receptors mediate morphine effects on phagocytosis by murine peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol* 2003;136:9-16.
- [267] Trejo J, Hammes SR, Coughlin SR. Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13698-702.
- [268] Tsao PI, von Zastrow M. Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 2000;275:11130-40.
- [269] Tucek S, Proska J. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:205-12.
- [270] Ulrich CD, 2nd, Holtmann M, Miller LJ. Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors. *Gastroenterology* 1998;114:382-97.
- [271] Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:125-32.
- [272] Walaas SI, Greengard P. 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* 1984;4:84-98.
- [273] Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12198-203.
- [274] Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 2003;23:1398-405.
- [275] Wardas J. Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia. *Front Biosci* 2008;13:4071-96.
- [276] Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP. The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* 1996;181:381-97.
- [277] Wenger T, Moldrich G. The role of endocannabinoids in the hypothalamic regulation of visceral function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:301-7.
- [278] White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, et al.

- Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 1998;396:679-82.
- [279] Whitfield HJ, Jr., Brady LS, Smith MA, Mamalaki E, Fox RJ, Herkenham M. Optimization of cRNA probe in situ hybridization methodology for localization of glucocorticoid receptor mRNA in rat brain: a detailed protocol. *Cell Mol Neurobiol* 1990;10:145-57.
- [280] Wise RA. Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 1996;6:243-51.
- [281] Woods AS, Huestis MA. A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12:88-96.
- [282] Wreggett KA, Wells JW. Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J Biol Chem* 1995;270:22488-99.
- [283] Yao L, Fan P, Jiang Z, Mailliard WS, Gordon AS, Diamond I. Addicting drugs utilize a synergistic molecular mechanism in common requiring adenosine and Gi-beta gamma dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:14379-84.
- [284] Yin HH, Lovinger DM. Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:8251-6.
- [285] Zhu X, Wess J. Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochemistry* 1998;37:15773-84.

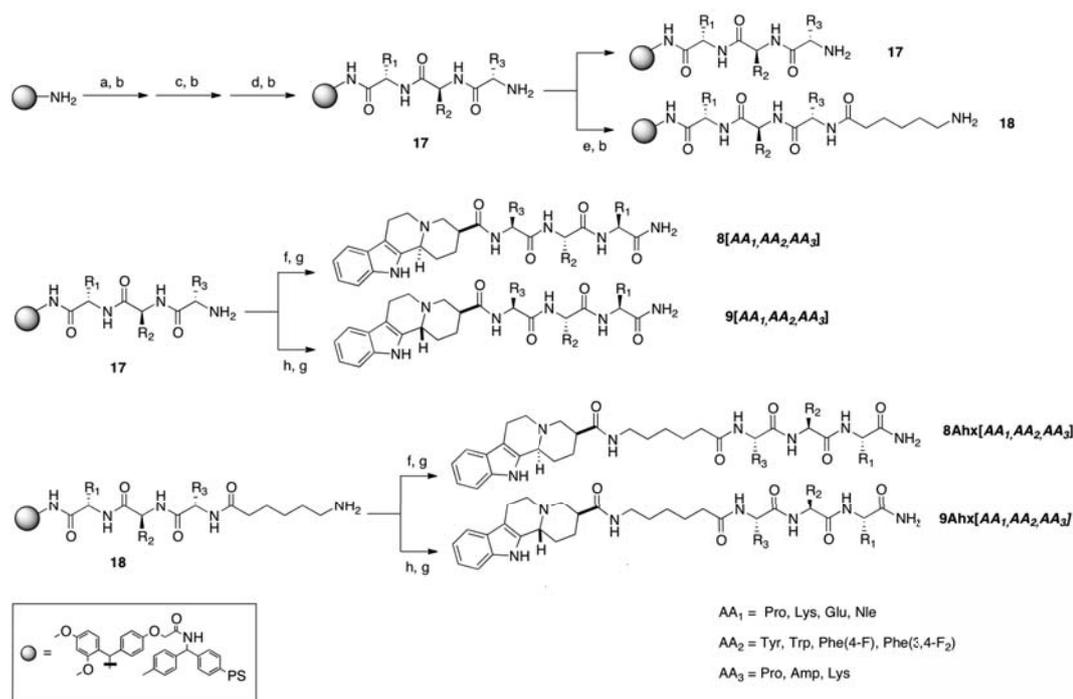
VII. APÈNDIX



APÈNDIX. 1

Quimioteca de compostos utilitzats al Capítol 3.

Esquema de la síntesi dels compostos.

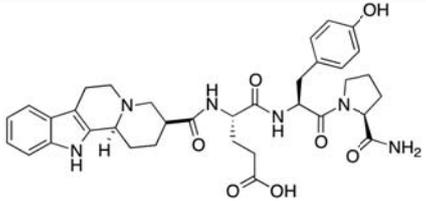
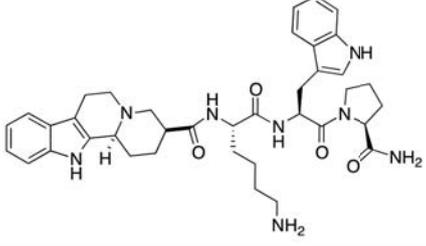
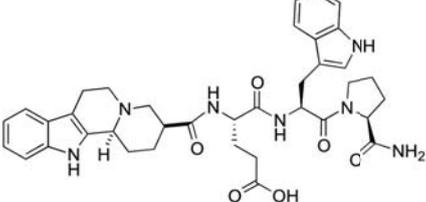
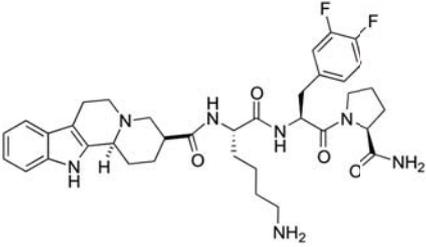
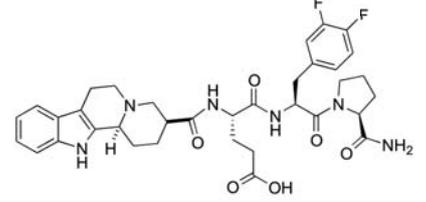
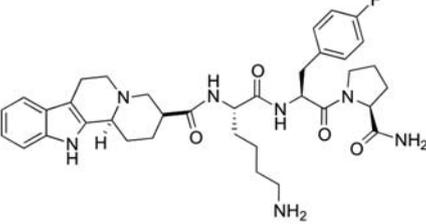


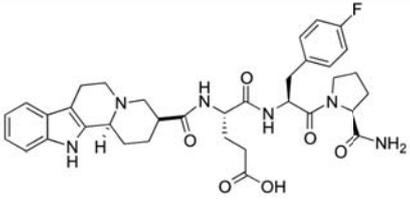
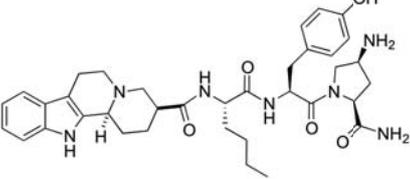
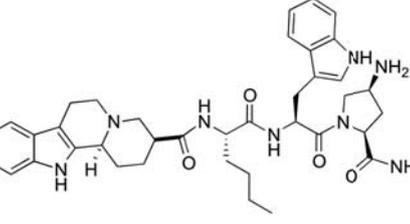
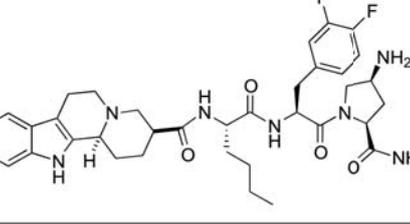
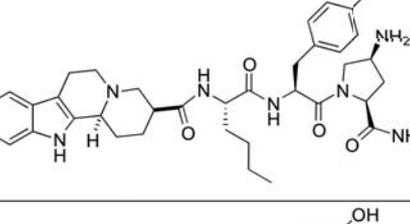
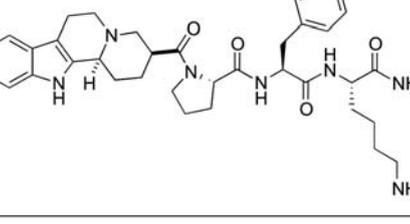
Scheme 2 | Solid-phase synthesis of indoloquinolidine-peptide hybrids. Conditions: a) Fmoc-AA₁-OH, DIPCDI/HOBt, b) piperidine-DMF (2:8), c) Fmoc-AA₂-OH, DIPCDI/HOBt, d) Fmoc-AA₃-OH, DIPCDI/HOBt, e) Fmoc-Ahx-OH, DIPCDI/HOBt, f) **8**, PyBOP/HOAt, DIEA, g) TFA-H₂O:DCM (95:2.5:2.5), h) **9**, PyBOP/HOAt, DIEA.

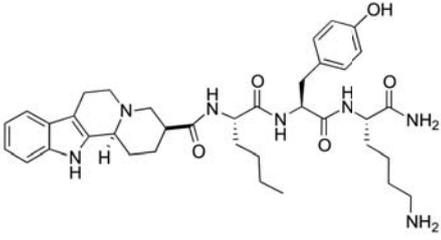
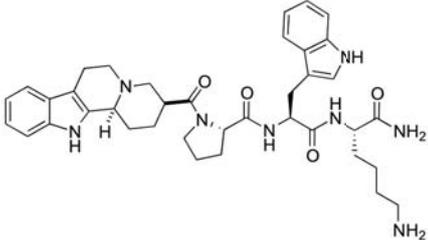
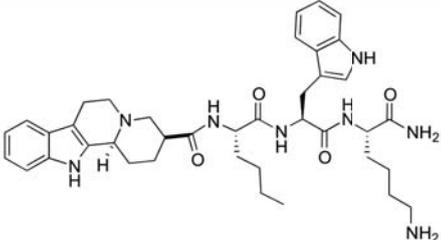
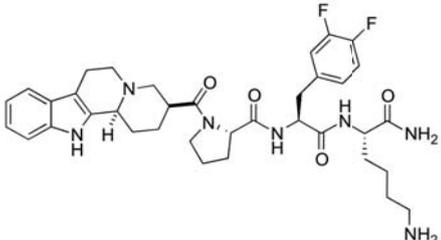
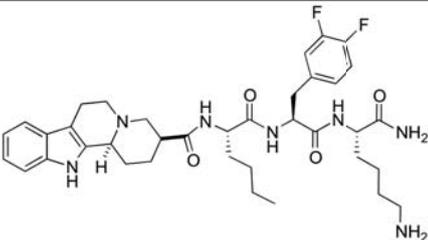
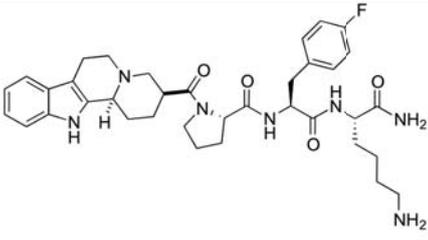
Llistat d'estructures i caracterització dels compostos.

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	M _{calc.}	M _{exp} ⁺ [M+H] ⁺	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y, %)
8[3,1,1]		5,93	657,4	329,9 658,4	91%- 93%	15,7 (40%)

⁺ When two masses are observed, it corresponds to [M+2H]²⁺ and [M+H]⁺ m/z respectively.

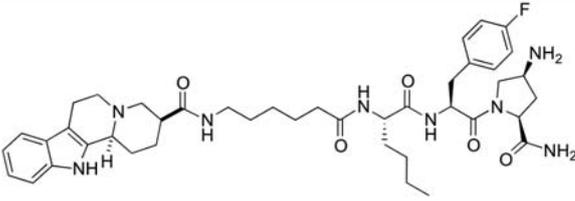
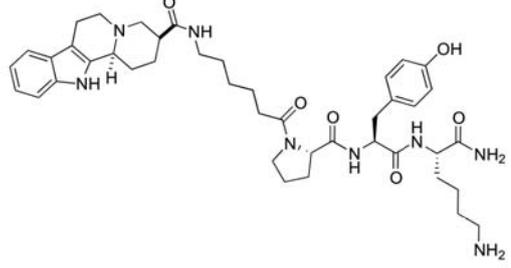
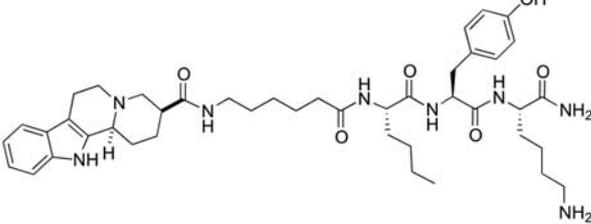
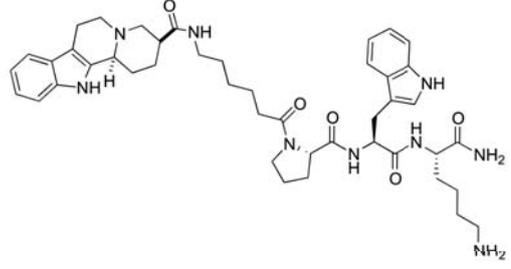
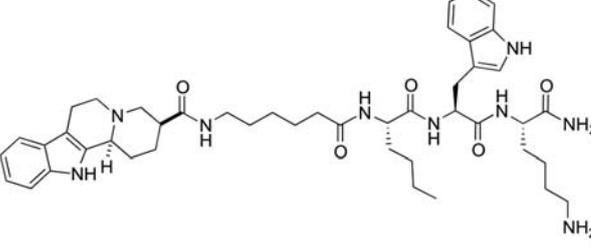
compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp * [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8[4,1,1]		6,41	658,3	659,4	92%- 89%	54,5 (n.d)
8[3,2,1]		6,79	680,4	341,4 681,5	97%- 95%	26,2 (64%)
8[4,2,1]		7,30	681,3	682,4	91%- 88%	44,9 (n.d)
8[3,3,1]		6,89	677,4	339,9 678,5	95%- 95%	17,4 (43%)
8[4,3,1]		7,47	678,3	679,4	96%- 92%	54,9 (n.d)
8[3,4,1]		6,73	659,4	330,9 660,4	87%- 83%	22,1 (56%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8[4,4,1]		7,29	660,3	661,4	90%- 92%	53,9 (n.d)
8[2,1,2]		6,36 6,64	657,4	329,9 658,4	97%- 93%	0,8 (2%)
8[2,2,2]		7,00 7,22	680,4	341,4 681,4	99%- 93%	2,7 (7%)
8[2,3,2]		7,20 7,43	677,4	339,9 678,4	93%- 95%	0,6 (1%)
8[2,4,2]		7,02 7,26	659,4	330,9 660,4	88%- 90%	0,5 (1%)
8[1,1,3]		5,54 5,82	657,4	329,9 658,5	94%- 96%	3,7 (9%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp [*] [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8[2,1,3]		6,19 6,52	673,4	337,9 674,5	94%- 96%	7,7 (19%)
8[1,2,3]		6,34 6,59	680,4	341,4 681,5	97%- 95%	10,8 (26%)
8[2,2,3]		6,92 7,20	696,4	349,4 697,5	97%- 95%	5,3 (13%)
8[1,3,3]		6,65 6,85	677,4	339,9 678,4	95%- 95%	4,1 (10%)
8[2,3,3]		7,18 7,44	693,4	347,9 694,4	95%- 89%	7,2 (17%)
8[1,4,3]		6,46 6,66	659,4	330,9 660,4	92%- 90%	4,0 (10%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp [*] [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8[2,4,3]		7,00 7,27	675,4	338,9 676,5	90%- 88%	6,9 (17%)
8Ahx[3,1,1]		6,12	770,5	386,4 771,5	80%- 88%	13,2 (29%)
8Ahx[4,1,1]		6,62	771,4	386,9 772,5	98%- 99%	4,3 (9%)
8Ahx[3,2,1]		6,78	793,5	398,0 794,5	85%- 95%	8,0 (17%)
8Ahx[4,2,1]		7,39	794,4	398,4 795,5	79%- 94%	68,4 (n.d)
8Ahx[3,3,1]		6,85	790,4	396,5 791,5	91%- 92%	6,6 (14%)

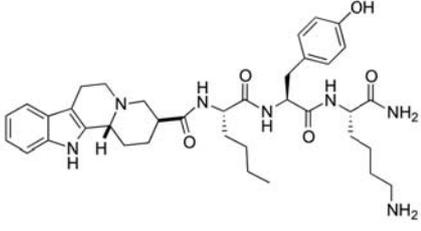
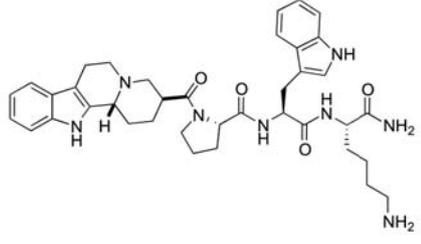
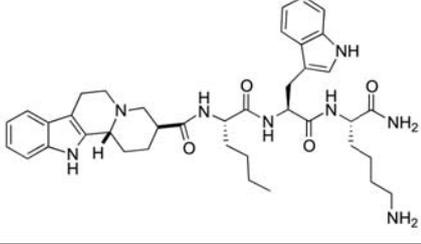
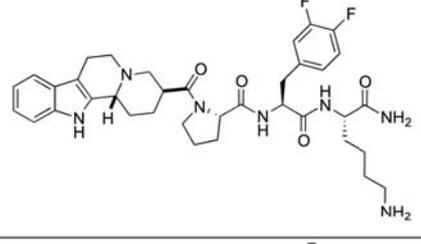
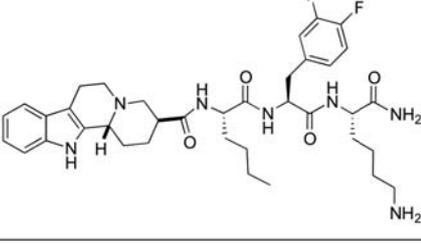
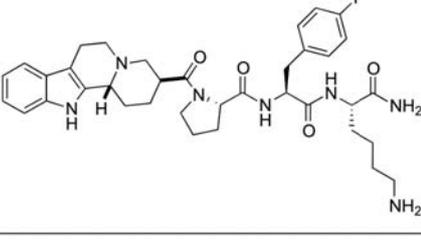
compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8Ahx[4,3,1]		7,51	791,4	792,5	99%- 99%	1,9 (4%)
8Ahx[3,4,1]		6,72	772,4	387,5 773,6	91%- 90%	5,0 (11%)
8Ahx[4,4,1]		7,33	773,4	774,5	99%- 99%	1,7 (4%)
8Ahx[2,1,2]		6,84	770,5	386,5 771,5	82%- 85%	0,8 (2%)
8Ahx[2,2,2]		7,40	793,5	398,0 794,6	92%- 98%	0,4 (1%)
8Ahx[2,3,2]		7,71	790,4	396,5 791,5	80%- 88%	0,5 (1%)

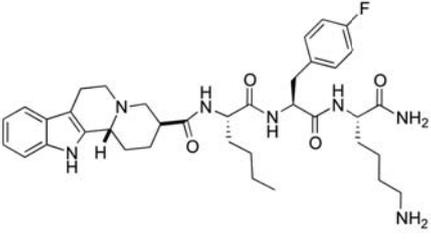
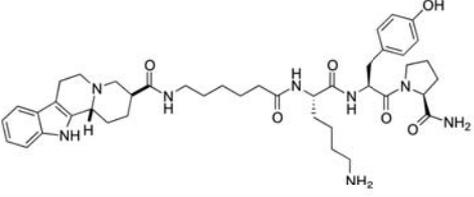
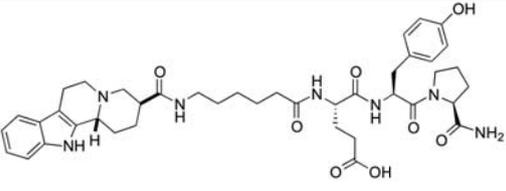
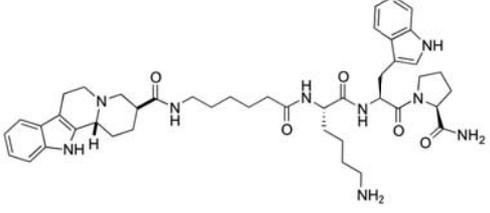
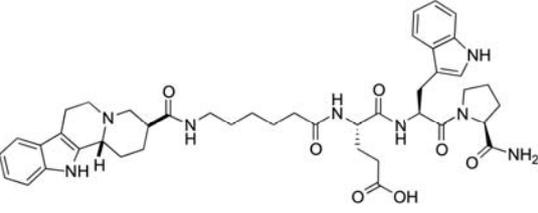
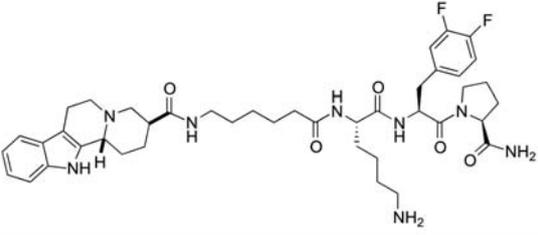
compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8Ahx[2,4,2]		7,52	772,4	387,5 773,5	92%- 90%	1,0 (2%)
8Ahx[1,1,3]		6,31	770,5	386,5 771,5	89%- 90%	2,7 (6%)
8Ahx[2,1,3]		6,84	786,5	394,5 787,5	85%- 87%	4,6 (10%)
8Ahx[1,2,3]		7,02	793,5	398,0 794,5	93%- 94%	4,7 (10%)
8Ahx[2,2,3]		7,47	809,5	406,0 810,5	83%- 86%	3,4 (7%)

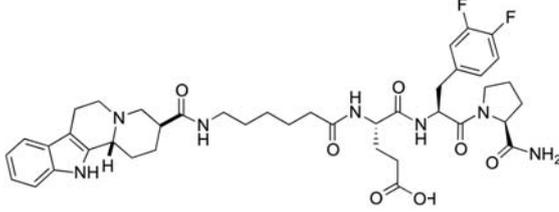
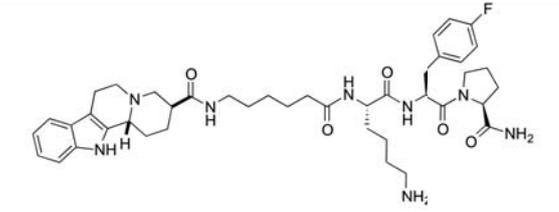
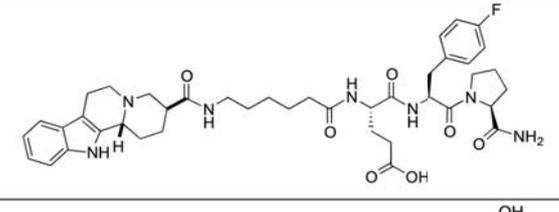
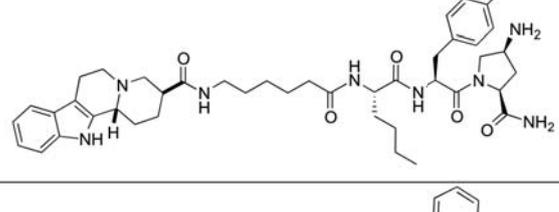
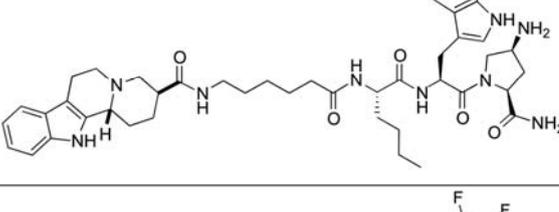
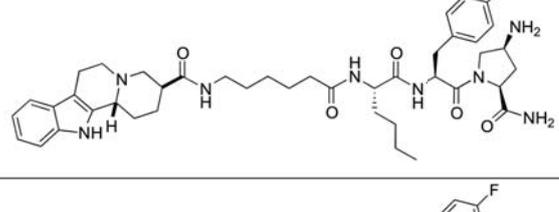
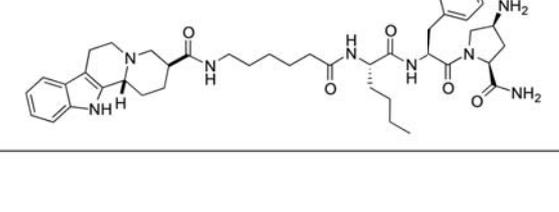
compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp * [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
8Ahx[1,3,3]	The structure shows a complex molecule with a central indole-like core. It features a long chain of amide linkages connecting various rings, including a piperidine ring and a fluorinated phenyl ring. The molecule has multiple amide groups and a terminal primary amine group.	7,21	790,4	396,4 791,5	91%- 90%	2,5 (5%)
8Ahx[2,3,3]	The structure is similar to 8Ahx[1,3,3] but with a different arrangement of amide linkages and a different fluorinated phenyl ring derivative.	7,77	806,5	404,5 807,5	99%- 98%	0,7 (1%)
8Ahx[1,4,3]	The structure is similar to 8Ahx[1,3,3] but with a different fluorinated phenyl ring derivative.	7,02	772,4	387,5 773,6	85%- 88%	22,0 (47%)
8Ahx[2,4,3]	The structure is similar to 8Ahx[2,3,3] but with a different fluorinated phenyl ring derivative.	7,59	788,5	395,5 789,5	96%- 98%	1,5 (3%)
9[3,1,1]	The structure is similar to the 8Ahx series but features a hydroxyl group on the fluorinated phenyl ring derivative.	5,84	657,4	329,9 658,4	99%- 94%	78,0 (n.d)

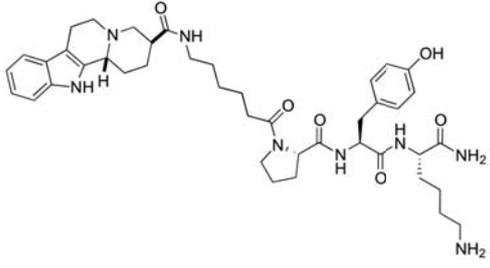
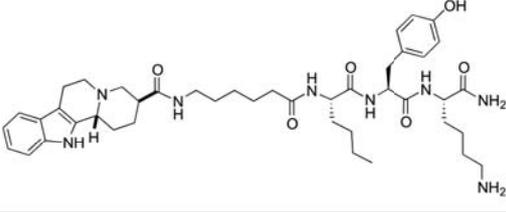
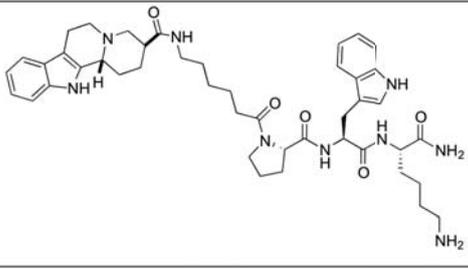
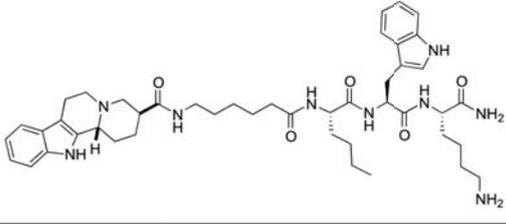
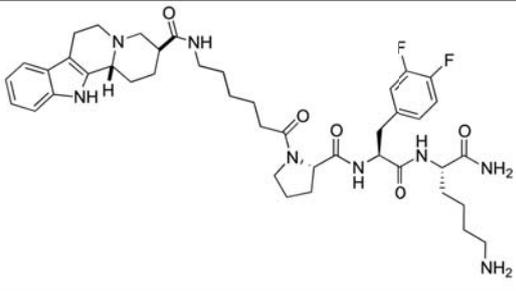
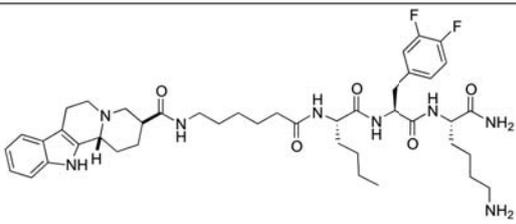
compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9[4,1,1]		6,33	658,3	659,4	90%- 90%	6,6 (17%)
9[3,2,1]		6,72	680,4	341,4 681,4	94%- 91%	30,7 (75%)
9[4,2,1]		7,23	681,3	682,4	92%- 91%	10,3 (25%)
9[3,3,1]		6,78	677,4	339,9 678,4	99%- 98%	17,6 (43%)
9[4,3,1]		7,38	678,3	679,4	96%- 93%	64,8 (n.d)
9[3,4,1]		6,63	659,4	330,9 660,4	98%- 96%	7,4 (19%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp [*] [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y, %)
9[4,4,1]		7,15	660,3	661,4	92%- 89%	17,6 (44%)
9[2,1,2]		6,46 6,57	657,4	329,9 658,4	91%- 80%	35,4 (90%)
9[2,2,2]		7,01	680,4	341,1 681,4	94%- 96%	6,0 (15%)
9[2,3,2]		7,30 7,33	677,4	339,9 678,4	97%- 95%	0,6 (1%)
9[2,4,2]		7,11	659,4	330,9 660,4	90%- 90%	0,8 (2%)
9[1,1,3]		5,85	657,4	329,9 658,5	94%- 92%	5,7 (14%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp [*] [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9[2,1,3]		6,43	673,4	337,9 674,5	93%- 95%	6,3 (16%)
9[1,2,3]		6,58 6,61	680,4	341,4 681,5	98%- 97%	6,9 (17%)
9[2,2,3]		7,13	696,4	349,5 697,5	99%- 98%	8,6 (21%)
9[1,3,3]		6,77	677,4	339,9 678,4	98%- 96%	4,3 (11%)
9[2,3,3]		7,40 7,44	693,4	347,9 694,4	94%-91	5,5 (13%)
9[1,4,3]		6,55	659,4	330,9 660,4	98%- 92%	4,8 (12%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp * [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9[2,4,3]		7,17	675,4	338,9 676,5	91%- 85%	9,8 (24%)
9Ahx[3,1,1]		6,02	770,5	386,5 771,5	80%- 89%	15,1 (33%)
9Ahx[4,1,1]		6,43	771,4	772,5	99%- 99%	0,7 (2%)
9Ahx[3,2,1]		6,69	793,5	398,0 794,5	93%- 94%	16,8 (35%)
9Ahx[4,2,1]		7,19	794,4	795,5	89%- 87%	42,9 (90%)
9Ahx[3,3,1]		6,71	790,4	396,5 791,5	99%- 99%	7,3 (15%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9Ahx[4,3,1]		7,26	791,4	792,4	99%- 83%	2,6 (5%)
9Ahx[3,4,1]		6,59	772,4	387,5 773,6	95%- 86%	9,7 (21%)
9Ahx[4,4,1]		7,16	773,4	774,4	99%- 99%	8,1 (17%)
9Ahx[2,1,2]		6,61	770,5	386,5 771,5	84%- 89%	1,0 (2%)
9Ahx[2,2,2]		6,15	793,5	398,0 794,5	96%- 93%	1,2 (3%)
9Ahx[2,3,2]		6,50	790,4	396,5 791,5	85%- 86%	5,9 (12%)
9Ahx[2,4,2]		7,23	772,4	387,5 773,5	81%- 83%	0,6 (1%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp * [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9Ahx[1,1,3]		6,04	770,5	386,5 771,5	99%- 98%	1,2 (3%)
9Ahx[2,1,3]		6,65	786,5	394,5 787,5	91%- 94%	5,5 (12%)
9Ahx[1,2,3]		6,82	793,5	398,0 794,5	99%- 97%	7,3 (15%)
9Ahx[2,2,3]		7,30	809,5	406,0 810,5	85%- 92%	2,4 (5%)
9Ahx[1,3,3]		6,99	790,4	396,4 791,5	93%- 91%	5,3 (11%)
9Ahx[2,3,3]		7,62	806,5	404,5 807,5	99%- 99%	2,1 (4%)

compound	structure	R _T HPLC ₁ (min)	Mcalc.	Mexp* [M+H ⁺]	%purity (sist ₁ - sist ₂)	mg (Y,%)
9Ahx[1,4,3]	<p>The structure of 9Ahx[1,4,3] consists of a 9-azabicyclo[3.3.1]nonane core fused to a benzene ring. This core is linked via a carbonyl group to a 6-aminohexanoate chain. This chain is further connected to a pyrrolidine ring, which is linked to a propanoate chain. The propanoate chain is substituted with a 4-fluorophenyl group and a 3-amino-1-propanyl group.</p>	6,82	772,4	387,5 773,5	93%- 98%	3,5 (8%)
9Ahx[2,4,3]	<p>The structure of 9Ahx[2,4,3] is similar to 9Ahx[1,4,3], but the propanoate chain is substituted with a 4-fluorophenyl group and a 1-propyl group instead of a 3-amino-1-propanyl group.</p>	7,36	788,5	395,5 789,5	83%- 80%	4,0 (8%)

n.d. not determined

APÈNDIX. 2

Figures Suplementàries del Capítol 4.

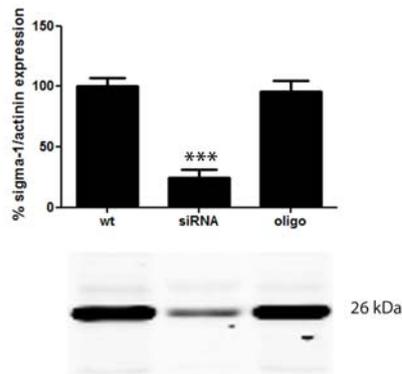


Figura S1. Efecte de la transfecció amb el siRNA del receptor σ_1 en l'expressió del receptor σ_1 . Les membranes de cèl·lules HEK-293 (wt) o de cèl·lules transfectades amb el siRNA del receptor σ_1 (6,25 μg d'oligonucleòtids) o nucleòtids irrelevantes (oligo, 6,25 μg d'oligonucleòtids) s'han analitzat per *western blot* i s'ha detectat la presència del receptor σ_1 amb l'anticòs anti- σ_1 . Els valors són la mitjana \pm SEM de tres experiments. *** $p < 0,001$ respecte a les cèl·lules no transfectades (la significativitat estadística s'ha calculat amb un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test de Bonferroni).

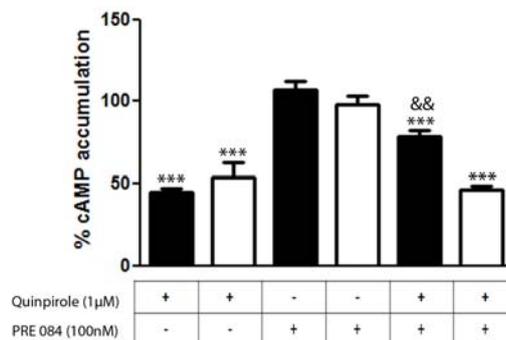


Figura S2. L'agonista del receptor σ_1 modula els descensos d'AMPc induïts per l'agonista del receptor D_2 . La producció d'AMPc s'ha determinat en cèl·lules CHO que expressen de manera estable els receptors D_2 transfectades (columnes blanques) o no (columnes negres) amb els siRNA corresponents al receptor σ_1 (6,25 μg d'oligonucleòtids). Les cèl·lules s'han estimulat amb forskolina (5 μM) en absència (100%) o en presència de quinpirole (1 μM) o PRE084 100 nM sols o en combinació. Es representa el percentatge d'AMPc produït respecte les cèl·lules tractades amb forskolina. Els valors són la mitjana \pm SEM de 5 experiments. La significativitat estadística s'ha calculat amb un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test de Bonferroni; *** $p < 0,005$ comparat amb les cèl·lules tractades amb forskolina i && $p < 0,01$ comparat amb les cèl·lules corresponents tractades només amb quinpirole.

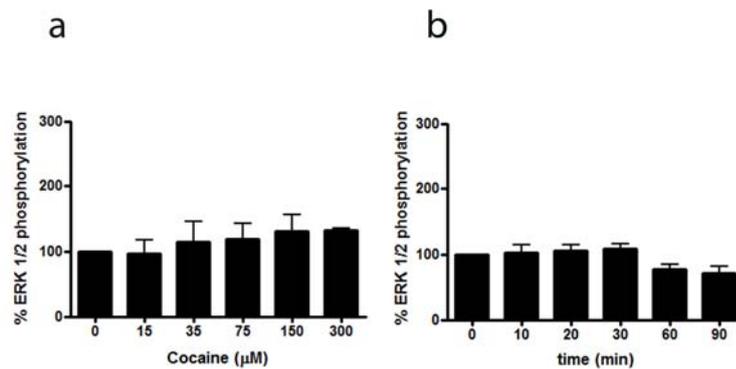


Figura S3. Efecte de la cocaïna en la fosforilació de ERK1/2 en cèl·lules que no expressen els receptors D₂. Les cèl·lules CHO s'han incubat amb concentracions creixents de cocaïna durant 30 min (a) o amb cocaïna 30 µM a diferents períodes de temps (b). La fosforil·lació de ERK1/2 es mostra com el percentatge respecte als nivells basals (100%; cèl·lules no tractades). Els resultats són la mitjana ± SEM de 3-4 experiments.

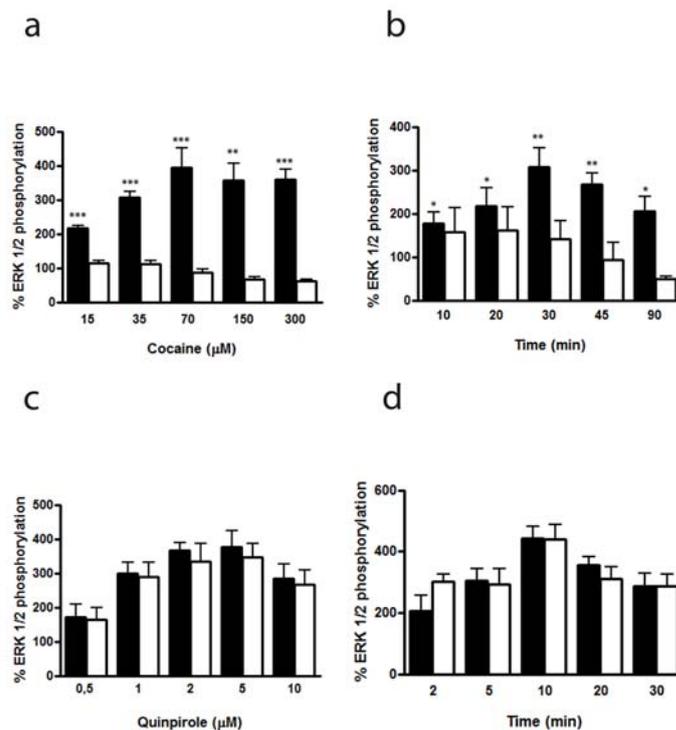


Figura S4. Fosforilació de ERK1/2 induïda per la cocaïna a través de l'heteròmer de receptors σ_1 -D₂ en cèl·lules transfectades. Les cèl·lules CHO s'han transfectat amb el cDNA del receptor D₂ (1 µg, columnes negres) o cotransfectat (columnes blanques) amb el cDNA del receptor D₂ i el siRNA del receptor σ_1 (6.25 µg d'oligonucleòtids) i s'han incubat amb concentracions creixents de cocaïna durant 30 min (a), amb cocaïna 30 µM a diferents períodes de temps (b), amb concentracions creixents de quinpirole durant 10 min (c) o amb quinpirole 1 µM a diferents períodes de temps (d). La fosforil·lació de ERK1/2 es representa com el percentatge respecte als valors basals (100%). Els valors són la mitjana ± SEM de 4-6 determinacions. La significativitat estadística s'ha calculat amb un anàlisi ANOVA unidireccional seguit d'un test de Bonferroni; *p<0,05, **p<0,01 and ***p<0,005 de les mostres comparades amb les que han rebut el mateix tractament amb transfecció amb siRNA.

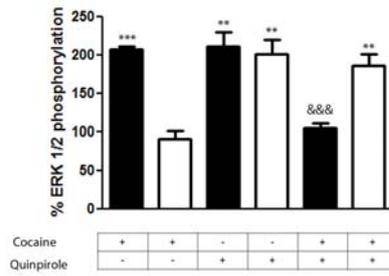


Figura S5. Interacció negativa entre la cocaïna i l'agonista del receptor D₂ quinpirole en la fosforilació de ERK1/2 en estriat de ratolí. Els talls estriatals de ratolins WT (columnes negres) o KO per al receptor σ_1 (columnes blanques) s'han tractat durant 10 min amb quinpirole 1 μ M amb 150 μ M de cocaïna o amb ambdós. S'han quantificat les bandes obtingudes de 6 talls de 5 animals diferents per a cada condició. Els valors són la mitjana \pm SEM del percentatge respecte els nivells de fosforil·lació de talls estriatals no tractats. ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,005$ representen valors significativament diferents respecte el basal segons un test ANOVA bidireccional. &&& $p < 0,005$ representa un valor significativament diferent respecte a la mostra tractada només amb quinpirole segons un anàlisi ANOVA seguit d'un test de Bonferroni.

APÈNDIX. 3

Figures i Taules Suplementàries del Capítol 6.

Taula S1. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB_1 sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D_2 en membranes de putamen pre- i postcomissural de macacos tractats amb MPTP. Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments	Parameters			
	B_{e1} (pmol/mg)	K_{D1} (nM)	B_{e2} (pmol/mg)	K_{D2} (nM)
[3H]YM-09151-02 vs dopamine				
Precomissural Putamen				
Not treated	0.21 \pm 0.04	7 \pm 3	0.14 \pm 0.01	590 \pm 170
+ CGS 21680 (250nM)	0.21 \pm 0.04	3.7 \pm 0.5	0.15 \pm 0.03	1300 \pm 800
+ CP 55940 (100nM)	0.21 \pm 0.02	1.8 \pm 0.7	0.20 \pm 0.03	1000 \pm 700
+ CGS 21680 + CP 55940	0.16 \pm 0.01	1.5 \pm 0.6	0.21 \pm 0.02	340 \pm 130
Postcomissural Putamen				
Not treated	0.5 \pm 0.03	7.2 \pm 0.3	0.24 \pm 0.1	380 \pm 40
+ CGS 21680 (250nM)	0.5 \pm 0.2	14 \pm 1	0.17 \pm 0.3	950 \pm 50
+ CP 55940 (100nM)	0.4 \pm 0.1	5 \pm 4	0.41 \pm 0.05	170 \pm 50
+ CGS 21680 + CP 55940	0.5 \pm 0.2	6 \pm 2	0.23 \pm 0.03	290 \pm 100

Per al putamen precomissural els valors són la mitjana \pm SEM de 4 experiments realitzats amb 4 animals diferents i per al putamen postcomissural els valors són la mitjana \pm SEM de 3 experiments realitzats amb 3 animals diferents.

Taula S2. Efecte dels agonistes dels receptors A_{2A} i CB_1 sobre l'afinitat de la dopamina per al receptor D_2 en membranes de putamen pre- i postcomissural de macacos discinètics (lesionats amb MPTP i tractats amb L-DOPA). Paràmetres obtinguts a partir d'experiments de competició.

Competition experiments	Parameters			
	B_{e1} (pmol/mg)	K_{D1} (nM)	B_{e2} (pmol/mg)	K_{D2} (nM)
[3H]YM-09151-02 vs dopamine				
Precomissural Putamen				
Not treated	0.17 \pm 0.05	4 \pm 0.1	0.20 \pm 0.01	230 \pm 100
+ CGS 21680 (250nM)	0.2 \pm 0.03	8 \pm 3	0.17 \pm 0.04	340 \pm 130
+ CP 55940 (100nM)	0.12 \pm 0.02	2.9 \pm 0.7	0.24 \pm 0.06	490 \pm 210
+ CGS 21680 + CP 55940	0.25 \pm 0.01	10 \pm 6	0.15 \pm 0.05	530 \pm 160
Postcomissural Putamen				
Not treated	0.39 \pm 0.09	10 \pm 1	0.15 \pm 0.03	670 \pm 280
+ CGS 21680 (250nM)	0.20 \pm 0.02	18 \pm 8	0.17 \pm 0.03	1150 \pm 200
+ CP 55940 (100nM)	0.37 \pm 0.06	11 \pm 1	0.15 \pm 0.03	620 \pm 230
+ CGS 21680 + CP 55940	0.3 \pm 0.1	11 \pm 9	0.14 \pm 0.09	480 \pm 230

Per al putamen precomissural els valors són la mitjana \pm SEM de 4 experiments realitzats amb 4 animals diferents i per al putamen postcomissural els valors són la mitjana \pm SEM de 3 experiments realitzats amb 3 animals diferents.w

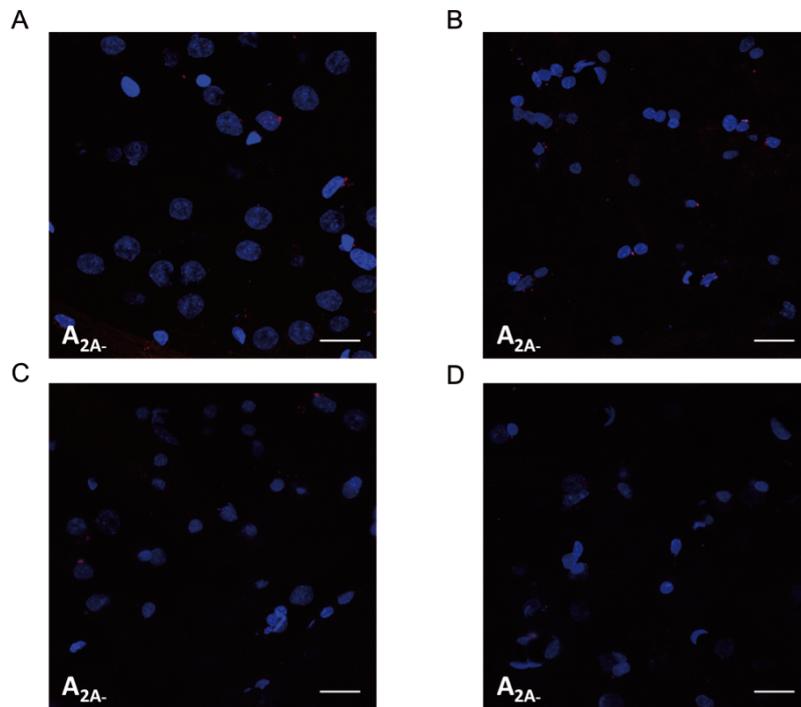


Figura S1. Controls negatius per als assajos de lligació per proximitat. Els controls negatius per als PLA s'han dut a terme en talls de caudat (A) o putamen (B) de macacos no lesionats o de caudat de macacos lesionats amb MPTP (C) o de macacos discinètics (D), incubant-los només amb l'anticòs primari de ratolí anti-A_{2A} i les dues sondes Duolink II PLA anti-ratolí i anti-conill, els nuclis cel·lulars s'han tenyit amb DAPI. Barra d'escala de 20 µm.

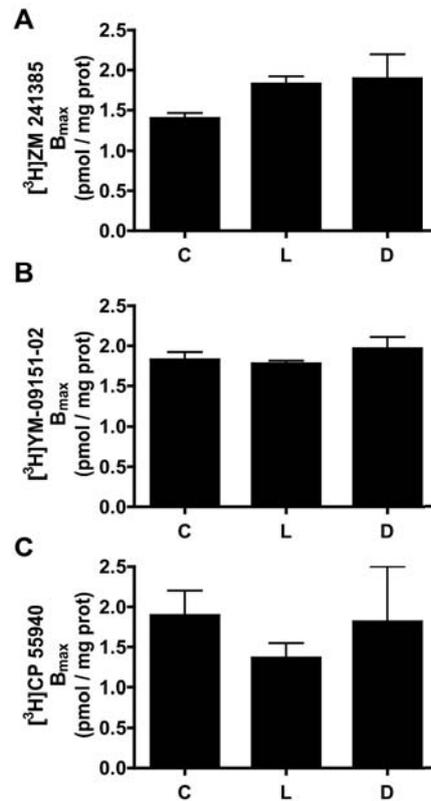


Figura S2. Expressió dels receptors A_{2A} , CB_1 i D_2 al caudat dels macacos model de PD. La unió màxima s'ha calculat a partir d'experiments de competició en membranes (0.3 mg de proteïna/ml) de macacos no lesionats (C) o lesionats amb MPTP (L) o discinètics (D; tractats amb L-DOPA), amb l'antagonista del receptor A_{2A} [3H]ZM 241385 (4 nM; A), l'antagonista del receptor D_2 [3H]YM-09151-02 (0.5 nM; B) o l'agonista del receptor CB_1 [3H]CP 55940 (6 nM; C) *versus* una concentració 50 μM dels mateixos lligands sense marcar radioactivament. Per al càlcul s'han considerat les següents constants d'afinitat: 1 nM per al ZM 241385, 0,6 nM per al YM-09151-02 i 4 nM per al CP 55940. Els valors són la mitjana \pm SEM de 4-6 determinacions.