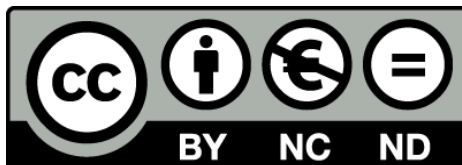




# Oligomerización del receptor A2A de adenosina: interpretando el receptorsoma

Jorge Gandía Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I TERAPÈUTICA EXPERIMENTAL

## **OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR $A_{2A}$ DE ADENOSINA: INTERPRETANDO EL RECEPTORSOMA**

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica  
**JORGE GANDÍA SÁNCHEZ**  
para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por  
Jorge Gandía Sánchez bajo la dirección del Dr. Francisco Ciruela Alférez

Dr. Francisco Ciruela Alférez

Jorge Gandía Sánchez

*Barcelona, Noviembre de 2013*



*A mi familia.*



Sí, yo tampoco me lo acabo de creer...

Muchas gracias.

“La ciencia tiene que ser divertida” (palabras tuyas). Bueno, está claro que contigo no puedo decir que me haya aburrido. He podido conocer cómo es la Ciencia (y la ciencia). He viajado. He vivido el cierre de etapas y también la ilusión de abrir nuevas. He aprendido. Mucho. Gracias, Paco.

Y el resto de esta mi segunda familia en la Unitat de Farmacologia.

Nunca pensé que tendría (tuve/he tenido) a una estrella del rock de compañero y gurú. Y qué suerte. Gracias, Víctor.

Con lo que habéis tenido que aguantar (y no solo musicalmente) teniéndome por aquí, no entiendo a qué vienen esos “¿y qué haremos cuando te vayas?”. Será por las risas, los lab-crisis, los cotilleos... ¿Y qué haré yo, eh? Os guardaré un rincón especial aquí (\*se señala con el dedo “ahí”\*). Gracias, Gloria (arigatoynomesémás), Maricel (me debes 10€), Fabi (you’re next!).

Quan em publiquin a Planeta “Les aventures de l’universitari mig actual” haurà estat possible només per la vostra col·laboració desinteressada. En això i en moltes altres coses. Gràcies, Àlex, Lourdes, Laura, Sílvia, Salud, Eulàlia, Toni, Josep Maria.

Los (ya no tan) nuevos me dejan preocupado, por el abuso de BonÀrea principalmente. No por el compañerismo, generosidad y ganas de aprender, de esto bien. Gràcies, Xavi, Jaume, Marc, Marta, Débora, Leandra.

Pasásteis por aquí y dudo que lleguéis a leer esto, pero os recuerdo y fue un placer compartir unos meses/años con vosotros. Gracias, Catarina, Koen, Laura, Kris, Laia, Siobhan, Katha, Kathy, Olavo, Raquel.

Y mi inicial familia (científica).

Em vau acollir i vau permetre els meus primers passets en aquest món. Gràcies, Carme, Enric, Pepi, Vicent, Antoni.

“Ets el meu millor ex”, em vas escriure. No, això tu, i ho saps. Gràcies, Gemma.

Quién me habría dicho que podría compartir laboratorio con tantas mujeres inteligentes, guapas, fuertes. Gracias, Aroa, Nuria, Laia, Carla, Pauli. Y que compartiría chelas y demás con unos tíos tan grandes. Gracias, Tipet, Chema, Edu, Rodrigo, Dani.

Us poso aquí, però per sort molts moments compartits han estat per altres “puestus”.  
Gràcies, Jordi, Marta.

Mientras los de más arriba (los séniors) fueron de “contigo aprendí”, vosotros habéis sido más de “contigo compartí”, ya fuera más o menos tiempo (para compensar ahí estuvieron los amigos invisibles, las cenas, las barbacoas). Gracias, Jasmina, Jana, Víctor, Marc, Lucía, Milena, Estefa, Isaac, Patrícia, Dasiel, F, Laia B,...

Es veu que vam fer la carrera junts i tot i així encara ens hem anat veient i compartint alegries i misèries. Que duri molt temps. Gracias K, F, Laura, Antía, Laureta, Montse, Gemma, Guillem, Emma.

Buf, hasta aquí hemos llegado y ya tengo la sensación de haberme olvidado a gente (“claro, tanto tiempo ha pasado que...”). No m’ho tingueu en compte. Gracias.

A mis amigos i amics que ya habéis dejado de pincharme con lo de “¿a ver cuando acabas de estudiar, no?”. Gracias. Por eso no, por todo el resto (bueno, y por eso también). Gràcies.

Sin vuestro apoyo, cariño y comprensión habría sido mucho más difícil llegar hasta aquí. Gracias, primos. Gràcies, Artur. Gracias, tiets, titos. Gracias, avi.

Me preguntaron una vez “Tienes un problemón y solo llamas a una persona que no pueden ser tus padres. ¿A quién llamas?” Pues a quién va a ser. Por las risas y por los piques. Por el ejemplo de ponerle ganas a todo. Gracias, Laura.

Por habérmelo dado todo. Por habérmelo aguantado todo. Por ser la mejor inspiración y de quien siempre aprenderé y a quien siempre querré. Muchas gracias, papa. Muchas gracias, mama.







# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G	5
1.1. Características generales	5
1.2. Clasificación de los GPCR	7
1.3. Oligomerización de los GPCR: papel funcional de la dimerización	9
2. RECEPTORES DE ADENOSINA	13
2.1. Características generales y clasificación	13
2.2. El receptor A <sub>2A</sub> de adenosina	15
3. OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR A <sub>2A</sub> R CON OTROS GPCR	16
3.1. El receptor A <sub>1</sub> de adenosina	16
3.2. El receptor D <sub>2</sub> de dopamina	18
3.3. El receptor metabotrópico 5 de glutamato	19
3.4. El oligómero A <sub>2A</sub> R/D <sub>2</sub> R/mGlu <sub>5</sub> R	20
4. INTERACCIÓN DE A <sub>2A</sub> R CON OTRAS PROTEÍNAS	22
4.1. $\alpha$ -actinina	22
4.2. Proteína neuronal de unión a calcio 2 (NECAB2)	23
OBJETIVOS	27
METODOLOGÍA	31
RESULTADOS	
1. ESTUDIO DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G: EL RECEPTOR A <sub>2A</sub> R Y LA FORMACIÓN DE HOMÓMEROS Y HETERÓMEROS DE ORDEN SUPERIOR A DOS	43
2. DETECCIÓN DE LAS INTERACCIONES DE GPCR CON OTRAS PROTEÍNAS MEDIANTE EL ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO DE MEMBRANA (MYTH)	53

3. VALIDACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA Y EL RECEPTOR HUÉRFANO GPR37

57

4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR HUÉRFANO GPR37

66

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

79

CONCLUSIONES

91

BIBLIOGRAFÍA

95

ANEXO I

"Detection of Higher-Order G Protein-Coupled Receptor Oligomers by a Combined Bret-Bifc Technique." Gandia, J., J. Galino, O. B. Amaral, A. Soriano, C. Lluís, R. Franco and F. Ciruela. *FEBS Lett* 582, no. 20 (2008): 2979-84.

ANEXO II

"Metabotropic Glutamate Type 5, Dopamine D2 and Adenosine A2a Receptors Form Higher-Order Oligomers in Living Cells." Cabello, N., J. Gandia, D. C. Bertarelli, M. Watanabe, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre, R. Lujan and F. Ciruela *J Neurochem* 109, no. 5 (2009): 1497-507.

ANEXO III

"The Parkinson's Disease-Associated Gpr37 Receptor-Mediated Cytotoxicity Is Controlled by Its Intracellular Cysteine-Rich Domain." Gandia, J., V. Fernandez-Duenas, X. Morato, G. Caltabiano, R. Gonzalez-Muniz, L. Pardo, I. Stagljar and F. Ciruela *J Neurochem* 125, no. 3 (2013): 362-72.

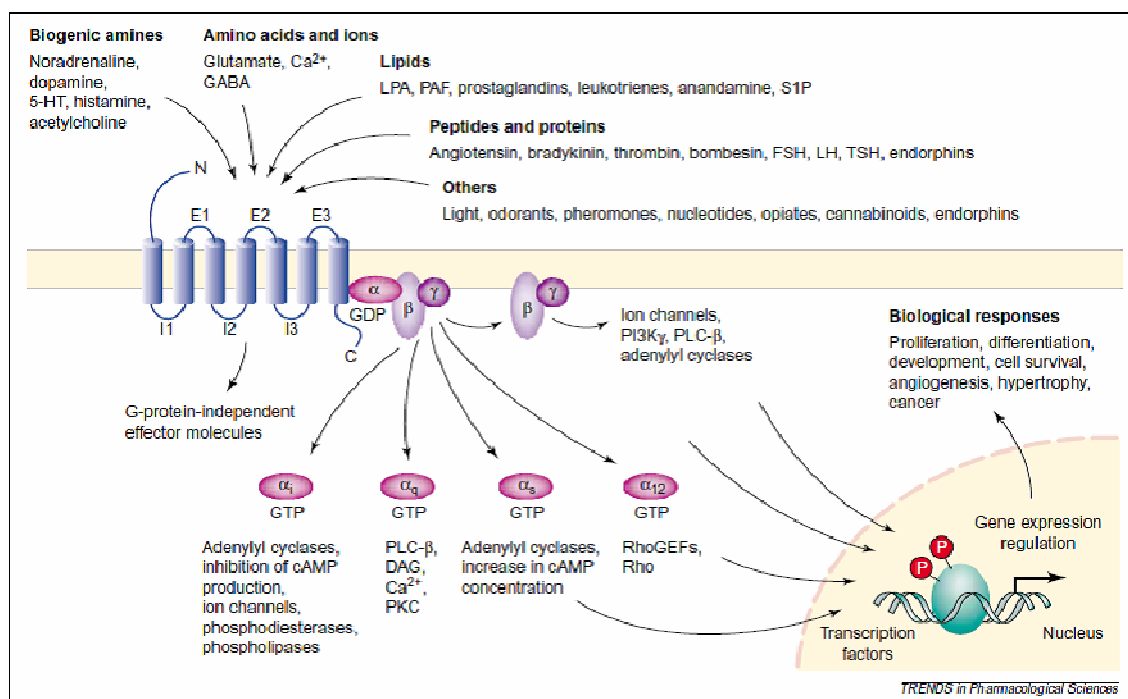
## **INTRODUCCIÓN**



## 1. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G

### 1.1. Características generales

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) constituyen el mayor grupo de receptores de superficie celular implicados en la transducción de señales (Gudermann et ál., 1997). A su vez, representan una de las mayores familias de proteínas en el genoma de mamíferos. Los estudios más recientes indican la presencia de 720-800 genes de GPCR humanos, lo que representa alrededor del 2% del genoma (Jacoby et ál., 2006; Fredriksson et ál., 2003).



**Figura 1.** Estructura general de un receptor acoplado a proteína G mostrando los mecanismos de señalización celular responsables de las diversas funciones biológicas. (Extraído de Marinissen, 2001)

Estos receptores presentan una estructura de 7 hélices  $\alpha$  que atraviesan la membrana conectadas por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, quedando el dominio N-terminal orientado hacia el medio extracelular y el C-terminal hacia el intracelular (Fig. 1). Se activan por una gran variedad de ligandos tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen hormonas y neurotransmisores peptídicos, aminas biogénicas, lípidos, nucleótidos, iones, moléculas de olor y fotones de luz, entre otros. Controlan multitud de funciones y procesos biológicos clave como la proliferación, la supervivencia celular, el metabolismo, la secreción, la diferenciación, las respuestas

## Introducción

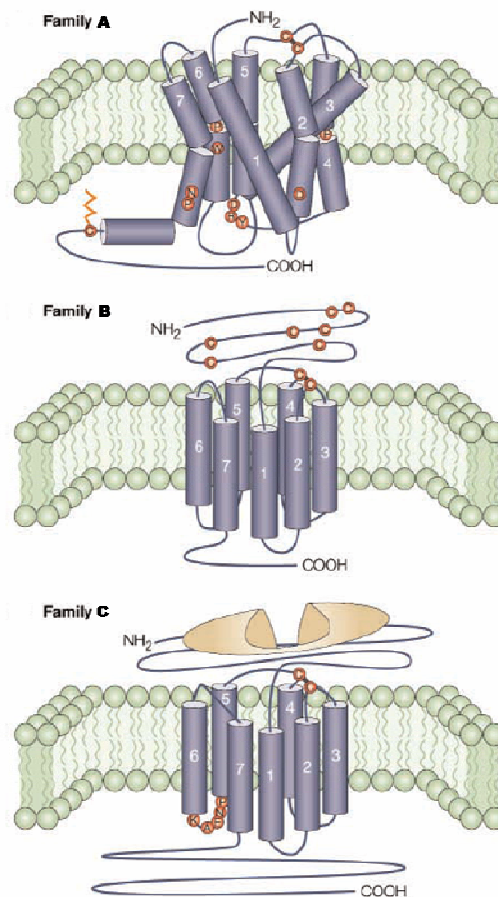
inflamatorias e inmunes o la neurotransmisión (Marinissen y Gutkind, 2001; Gether, 2000).

Los receptores acoplados a proteína G deben su nombre a su interacción con las proteínas G heterotriméricas, constituidas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La unión del ligando al receptor, induce cambios conformacionales que se transmiten desde el receptor a la proteína G que hacen que la subunidad  $\alpha$  libere GDP y una GTP. El mecanismo más comúnmente aceptado es que este intercambio de GDP por GTP desestabiliza el trímero y permite la disociación de la subunidad  $G_{\alpha}$ -GTP del dímero  $\beta\gamma$ . La proteína G a través de  $G_{\alpha}$ -GTP, del dímero  $\beta\gamma$  o de ambos, interactúa y modula la función del efector. La señal termina cuando la actividad intrínseca GTPasa de  $G_{\alpha}$  hidroliza el GTP a GDP y fosfato (Bourne et ál., 1991). Entre los sistemas efectores modulados por GPCR destacan la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y D, los canales iónicos y sistemas antiporte de la membrana plasmática (Hamm, 1998). La complejidad de la señalización de los GPCR ha sido realzada por datos que indican que estos receptores pueden actuar no sólo a través de la proteína heterotrimérica G sino que también actúan por mecanismos independientes de la proteína G (Daaka et ál., 1998; Lefkowitz, 1998).

Además del acoplamiento y activación de la proteína G, la unión de un agonista a un GPCR inicia un proceso de feedback negativo conocido como desensibilización. Este proceso disminuye la señalización del receptor y evita los posibles efectos perjudiciales de una excesiva estimulación celular. El mecanismo de desensibilización empieza generalmente por la fosforilación del receptor, por parte de quinasas intracelulares no específicas de receptores o específicas de GPCR (*GPCR kinase*, GRK), inducida por la unión del agonista. Los GPCR fosforilados reclutan la proteína citosólica arrestina. Este complejo (receptor fosforilado/arrestina) previene el acoplamiento del receptor a su proteína G, reduciendo la capacidad de señalización del receptor. La resensibilización se desencadena por la internalización del receptor desacoplado a los compartimentos endosomales, lo que permite la señalización del receptor por vías independientes de la proteína G (Daaka et ál., 1998; Lefkowitz, 1998) y facilita la desfosforilación del receptor por una proteína fosfatasa y el reciclaje hacia la superficie celular o la degradación (Metaye et ál., 2005).

## 1.2. Clasificación de los GPCR

Los GPCR se han clasificado según diferentes sistemas. Uno de los más clásicos es el sistema Kolakowski (Kolakowski, Jr., 1994) en que se clasifican los GPCR en 6 familias (A-F) según su estructura y características genéticas. En la figura 2 se ilustran las tres familias mayoritarias.



**Figura 2.** Las tres principales familias de GPCR. Los puntos resaltados en un color diferente representan residuos conservados entre los miembros de cada familia (Extraído de George et ál., 2002)

La familia A contiene el 90% de todos los GPCR, siendo la más grande y la más estudiada e incluye a receptores de una gran variedad de hormonas y neurotransmisores. La homología global entre los receptores de esta familia es baja y restringida a un número de residuos altamente conservados. Los receptores se caracterizan por tener un puente disulfuro que conecta el primer y segundo bucle extracelular. Muchos receptores de esta familia tienen una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal que sirve de anclaje a la membrana plasmática (Figura 2 zigzag naranja). El estudio de la estructura cristalográfica de la rodopsina (Palczewski et ál., 2000) indica que los dominios



## Introducción

transmembrana están inclinados y enroscados debido a la presencia de aminoácidos como la prolina que deforma el dominio helicoidal transmembrana. En estos receptores el ligando se une normalmente a una cavidad formada por los dominios transmembrana, aunque para alguna subfamilia de receptores de péptidos pequeños el reconocimiento se produce a nivel de los bucles extracelulares y del dominio N-terminal (George et ál., 2002; Jacoby et ál., 2006).

La familia B incluye aproximadamente 50 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como la calcitonina o el glucagón. La principal característica de esta familia es un extremo amino terminal relativamente largo (aproximadamente 100 residuos) que contiene varias cisteínas que forman una red de puentes disulfuro (Ulrich et ál., 1998). Así, los ligandos peptídicos son reconocidos por el extenso dominio N-terminal de estos receptores (George et ál., 2002; Jacoby et ál., 2006).

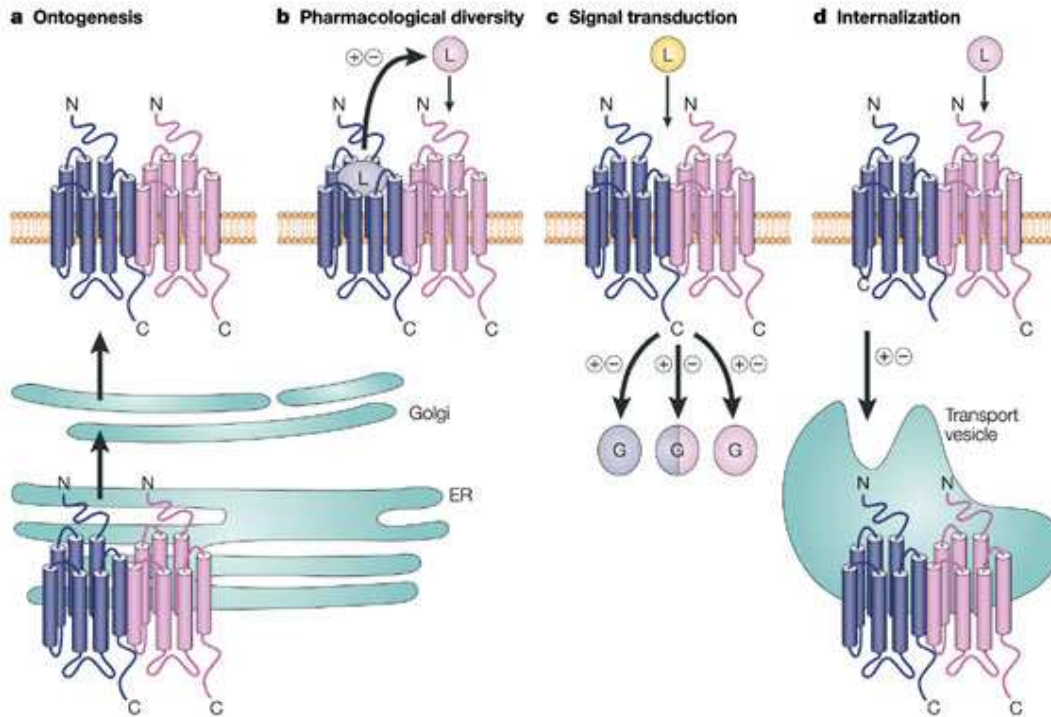
Por último, la familia C incluye a los receptores metabotrópicos de glutamato, los receptores sensibles a calcio y los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico B (GABAB). Estos receptores se caracterizan por tener unos dominios C-terminal y N-terminal excepcionalmente largos (500-600 aminoácidos). La estructura del lugar de unión (representado en la figura 2 en amarillo) se ha deducido mediante estudios de cristalografía del extremo N-terminal del receptor metabotrópico de glutamato solubilizado y unido a glutamato. Se ha visto que forma un dímero unido por puente disulfuro (Pin et ál., 2003) y que actúa como la planta carnívora Venus, es decir que puede abrirse y cerrarse en el proceso de unión del ligando. Excepto por las dos cisteínas conservadas en los bucles extracelulares 1 y 2, respectivamente, que forman un puente disulfuro putativo, esta familia no tiene ninguna característica común con las familias A y B. Una característica única de los receptores de la familia C es que el tercer bucle intracelular es corto y altamente conservado y, al igual que en la familia B, tampoco se conoce la orientación de los dominios transmembrana (George et ál., 2002; Jacoby et ál., 2006).

Aunque la clasificación A-F está ampliamente aceptada, Fredriksson y colaboradores (Fredriksson et ál., 2003) efectuaron el primer estudio filogenético de toda la superfamilia de GPCR en el genoma de mamífero, proponiendo una clasificación más

detallada. En sus análisis se muestra que hay 5 familias principales para los GPCR humanos: *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* y *Secretin* (la clasificación GRAFS, basada en sus iniciales) y que dentro de cada familia los receptores comparten un origen evolutivo común. Tres de estas familias, rodopsina (A), secretina (B) y glutamato (C) corresponden con la clasificación A-F, mientras que las otras dos familias, *adhesion* y *frizzled*, no están incluidas. En esta clasificación la superfamilia de la rodopsina sigue siendo la mayor, y se ha dividido en 4 grupos principales con 13 ramas distintas. Los autores de este nuevo sistema de clasificación defienden la teoría de que los receptores acoplados a proteína G surgieron a partir de un único predecesor común, que evolucionó a través de duplicaciones génicas, evolucionando desde la mayor simplicidad en cuanto a sus orígenes a la enorme complejidad que muestra la superfamilia de estos receptores en la actualidad. La enorme diversidad que alcanza esta superfamilia de proteínas de membrana da a entender el gran papel que juegan en la fisiología de cualquier organismo.

### *1.3. Oligomerización de los GPCR: papel funcional de la dimerización*

Históricamente, el modelo de funcionamiento de los GPCR describía a estos receptores como monómeros que se unían a su correspondiente proteína G en una proporción 1:1. Así, se consideraba que tras la unión de su ligando correspondiente, en el receptor se producían únicamente interacciones intramoleculares que daban lugar a las conformaciones “activa” e “inactiva”. Sin embargo, en la actualidad se ha aceptado que las interacciones intermoleculares con otras proteínas, y muy destacablemente con otros GPCR, son una característica común de estos receptores. Esta forma de organización puede presentar características diferentes de las de los monómeros constituyentes y está implicada en su funcionalidad a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferir nuevas propiedades farmacológicas a los receptores expresados en el dímero. La disponibilidad de un gran número de técnicas para el estudio de la dimerización de GPCR ha facilitado enormemente la investigación de su papel en la regulación de estos receptores. Esto ha proporcionado una nueva perspectiva para considerar cual es la unidad de señalización de los GPCR, así como para el desarrollo de ligandos que actúan a través de este tipo de complejos.



**Figura 3.** Relevancia fisiológica de la heterodimerización de GPCR. Ejemplos de la influencia de la interacción entre dos GPCR diferentes en su funcionalidad final, afectando a la expresión en la superficie celular, la afinidad por ligandos (L), la transducción de la señal por proteína G (G) o el mecanismo de internalización. (Diseñada por M. Bouvier para Ellis, 2004)

Aunque en muchos casos la relevancia fisiológica no se conoce completamente, diversos estudios llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos han sugerido distintos papeles funcionales para la oligomerización de GPCR (Fig. 3). Por ejemplo, la oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de los GPCR, es decir, en el control de calidad del plegamiento y de la destinación a la membrana de receptores sintetizados de novo. Asimismo, en algunos casos se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando. También se ha constatado que la oligomerización confiere diversidad farmacológica, ya que la dimerización posibilita al ligando de un receptor influir en la unión de otro ligando al segundo receptor dentro del dímero (Ferre et ál., 2007c; Franco et ál., 2008). La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado ligando afectando la selectividad de interacción entre el receptor correspondiente y su proteína G, resultando en una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G. Finalmente, también se ha visto que la oligomerización puede alterar el patrón endocítico para un determinado receptor (Terrillon y Bouvier, 2004).

Una de las observaciones más significativas para indicar que la dimerización de los GPCR puede ser importante en el correcto plegamiento del receptor y su transporte a la superficie celular proviene de los estudios del receptor GABA<sub>B</sub>. Tres estudios publicados simultáneamente en 1998 (Jones et ál., 1998; Kaupmann et ál., 1998; White et ál., 1998) demostraron que la coexpresión de dos isoformas del receptor GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>, era un prerrequisito para la formación de un receptor funcional en la superficie celular. Cuando se expresan separadamente, la isoforma GABA<sub>B1</sub> es retenida intracelularmente en el RE como una glicoproteína inmadura, sin embargo, la isoforma GABA<sub>B2</sub> es transportada a la superficie celular pero no puede unir GABA ni iniciar la transducción de la señal. La dimerización de GABA<sub>B1</sub>/GABA<sub>B2</sub>, a través de interacciones coiled-coil del extremo carboxi terminal, enmascara la señal de retención en el retículo endoplasmático (RE), por lo tanto permite el transporte del receptor desde el RE a la membrana plasmática como dímero funcional.

En estudios posteriores, se demostró que GABA<sub>B2</sub> sirve como una chaperona que es esencial para el apropiado plegamiento y transporte a la superficie celular de GABA<sub>B1</sub> (Margeta-Mitrovic et ál., 2000). Estas evidencias, junto al hecho de que un mutante de la isoforma GABA<sub>B1</sub> con capacidad de alcanzar la membrana plasmática tampoco es por sí sólo capaz de iniciar la transducción de señal, sugieren que el heterodímero es la unidad funcional (Margeta-Mitrovic et ál., 2000).

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

## Introducción

Se ha demostrado que los receptores de dopamina D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> forman heterómeros en células transfectadas (Lee et ál., 2004). Los receptores D<sub>1</sub> están acoplados a proteína G<sub>s</sub> mientras que los D<sub>2</sub> están acoplados a proteína G<sub>i</sub>. De manera interesante, cuando los receptores D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> forman el heterómero en lugar de acoplarse a G<sub>s</sub> o G<sub>i</sub> se acoplan a una proteína G heterotrimérica diferente, G<sub>q/11</sub>. De hecho, la dopamina cuando activa al receptor D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en el heterómero no da lugar a la señalización vía AMPc y PKA sino que moviliza calcio y activa la calmodulina quinasa. Recientemente, el mismo grupo ha demostrado que estos heterómeros existen in vivo y que su activación lleva a la activación de la calmodulina quinasa en el núcleo accumbens (Rashid et ál., 2007).

Existen evidencias que indican que es el dímero el que interacciona con una única proteína G y que la dimerización es un prerequisite para la activación de la proteína G, como en el caso del receptor de leucotrieno B<sub>4</sub> (Baneres y Parello, 2003). A este respecto es interesante conocer si la unión del agonista a una subunidad simple o a ambas subunidades de un dímero es suficiente para la activación de la proteína G. Recientemente se ha descrito que la ocupación con un agonista de una simple subunidad del dímero es suficiente para la activación de la proteína G, resultado consistente con varios estudios que demuestran transcomplementación entre un receptor defectuoso en unión de ligando y un receptor defectuoso en activación de la proteína G (Carrillo et ál., 2003). Estudios recientes con el receptor de glutamato, demostraron que sólo una subunidad del receptor por cada dímero puede alcanzar un estado activo completo al mismo tiempo (Goudet et ál., 2005; Hlavackova et ál., 2005), lo que ha llevado a proponer que la proteína G es la responsable de este funcionamiento asimétrico de un dímero. Damian y col. publicaron la primera demostración experimental de esta propuesta analizando el dímero del receptor de leucotrieno BLT1 (Damian et ál., 2006), los datos demostraron que la proteína G es responsable de la conformación activa asimétrica del dímero del receptor de leucotrieno BLT1 y que el desacoplamiento de la proteína G, a través de la adición de GTPγ[S], lleva a un dímero simétrico con los dos receptores activados.

Es importante destacar que los receptores que componen un heterodímero pueden tener diferentes mecanismos de internalización, y la heteromerización puede también modular las propiedades de tráfico de los GPCR inducidas por agonista. Este es el caso del heterodímero de los receptores de somatostatina SSTR1 y SSTR5 que es internalizado a

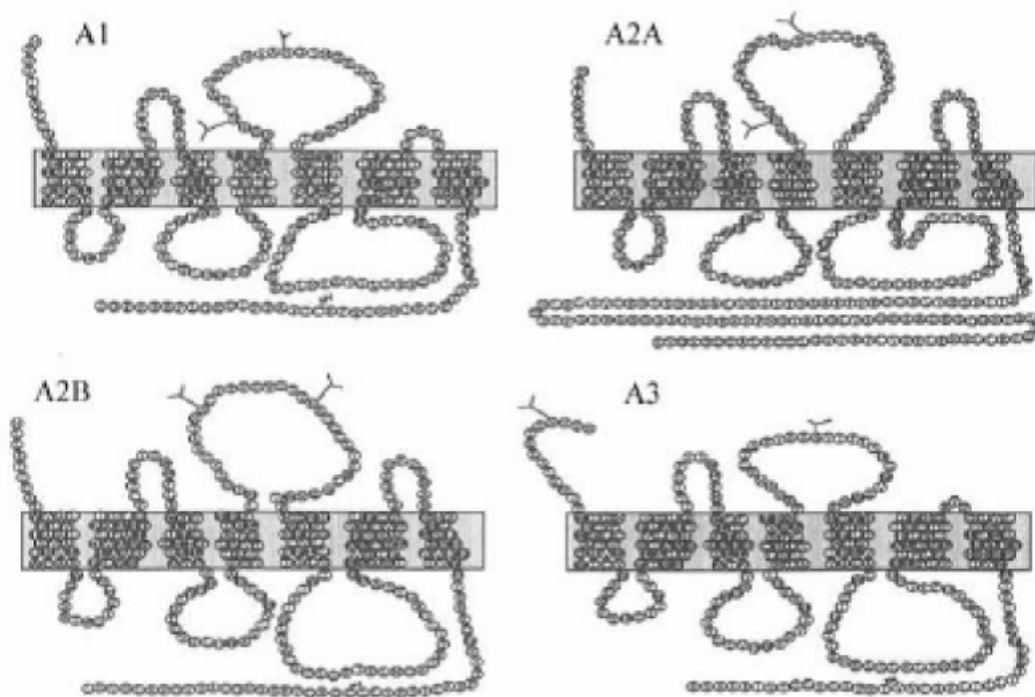
pesar de la resistencia a la internalización que presenta el monómero SSTR1 (Rocheville et ál., 2000). La mayor parte de la familia A de receptores acoplados a proteína G responde al agonista con la rápida internalización del receptor desde la superficie celular y hay estudios que indican que el receptor internaliza como dímero u oligómero (Yesilaltay y Jenness, 2000), más aún, se ha demostrado que la internalización de un GPCR puede ser modulada por la heterodimerización (Breit et ál., 2004; Torvinen et ál., 2005).

## 2. RECEPTORES DE ADENOSINA

### *2.1. Características generales y clasificación*

La adenosina es un importante neuromodulador implicado en una gran variedad de actividades cerebrales. Es secretada por la mayoría de células del sistema nervioso central, incluyendo neuronas y células gliales, y modula la actividad nerviosa actuando pre-, post- y/o extrasinápticamente. Lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con diferentes receptores de membrana acoplados a proteína G. Estos receptores se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas en 4 subtipos: los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub> (Ribeiro et ál., 2002) (Fig. 4).

La adenosina lleva a cabo la neuromodulación a través de la activación de sus receptores de alta afinidad: A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub>. El A<sub>2B</sub> y el A<sub>3</sub> son receptores de adenosina de baja afinidad por lo que su activación puede ser relevante en condiciones en las que la concentración de adenosina se ve incrementada de forma notoria. Se puede considerar a la adenosina como un modulador de la actividad nerviosa, que con pequeños efectos sincroniza las actividades neuronales, controlando la transmisión y plasticidad sináptica (Ribeiro et ál., 2002). Los receptores de adenosina participan en distintos procesos como sueño, vigilia, aprendizaje, memoria, daño neuronal, neurodegeneración y maduración neuronal. Estas funciones pueden tener implicaciones en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson, o en la epilepsia, episodios de hipoxia/isquemia e incluso en la adicción a drogas, donde el control del grado de activación de los receptores de adenosina puede tener muchas aplicaciones terapéuticas (Ribeiro et ál., 2002).

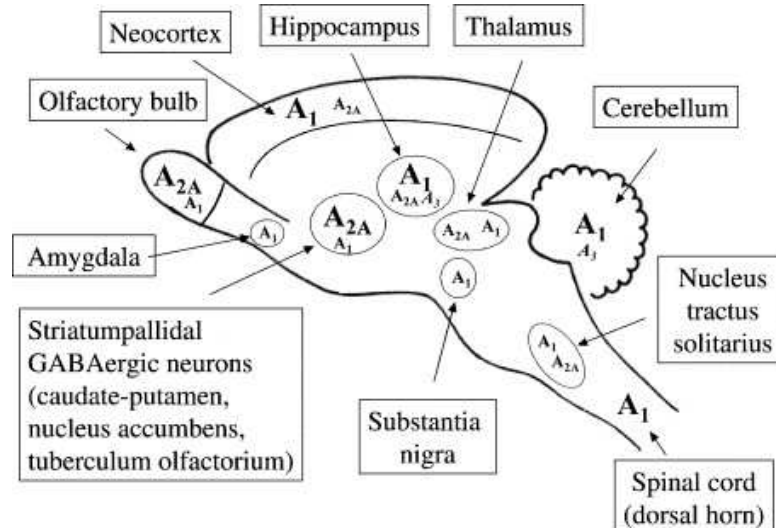


**Figura 4.** La familia de receptores de adenosina, indicando los lugares de glicosilación del segundo bucle extracelular (ECL2) y la cola N-terminal, en el caso del receptor A<sub>3</sub> (Extraído de Ribeiro et ál., 2003)

El grado de homología entre los receptores de adenosina es bajo, del orden del 45% (Pierce et ál., 1992; Stehle et ál., 1992). Al igual que para otros GPCR, la mayor homología tiene lugar en las regiones transmembrana, que se cree están próximas entre sí formando el centro de unión del ligando conjuntamente con la zona hipervariable correspondiente a la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular (Fredholm et ál., 1994; Rivkees, 1994). La interacción con la proteína G tiene lugar básicamente en el tercer bucle intracelular y en el extremo C-terminal. Los receptores de adenosina presentan secuencias consenso de fosforilación en los dominios intracelulares. Esta fosforilación está implicada en el mecanismo de desensibilización de los receptores (Palmer et ál., 1994).

Dado que la adenosina participa en una gran variedad de funciones del SNC, es fácil suponer que los diversos subtipos de receptores estarán acoplados a diferentes señales intracelulares. Así, el receptor A<sub>1</sub> que se acopla a proteínas G<sub>i/o</sub> (Munshi et ál., 1991) provoca la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (Londos et ál., 1980) y la activación de la fosfolipasa C (PLC) con el consiguiente incremento en los niveles de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) en el interior celular (Gerwins y Fredholm, 1992), lo

que incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. También provoca la activación de varios tipos de canales de  $\text{K}^+$ , probablemente vía las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  (Trussell y Jackson, 1985) e inhibe los canales de calcio (MacDonald et ál., 1986). El receptor  $A_3$  también inhibe a la AC a través del acoplamiento a la proteína  $G_i$  (Zhou et ál., 1992), aunque también puede acoplarse a la proteína  $G_q$  de forma que activa la PLC incrementando los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Abbracchio et ál., 1995). La principal vía de señalización de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  es la estimulación de la formación de AMPc (adenosín monofosfato cíclico) a través de la proteína  $G_s$ , lo que a su vez estimula a la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA, regulando el estado de fosforilación de varios substratos intracelulares. Sin embargo, el receptor  $A_{2A}$  puede acoplarse también a proteínas  $G_{olf}$  (Kull et ál., 2000) y el receptor  $A_{2B}$  a proteínas  $G_q$  mediando la activación de la PLC y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dependiente de DAG e  $\text{IP}_3$  (Feoktistov y Biaggioni, 1995). Se ha observado que todos los receptores de adenosina activan a la vía de las MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) y en concreto inducen la fosforilación de ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), pero, dependiendo del contexto celular, las vías de señalización implicadas pueden variar (Schulte y Fredholm, 2003; Seidel et ál., 1999).



**Figura 5.** Distribución en las regiones del SNC de los principales receptores de adenosina en el cerebro ( $A_1$ ,  $A_{2A}$  y  $A_3$ ). El tamaño de la fuente utilizada denota el nivel de expresión. (Extraído de Ribeiro et ál., 2003)

## 2.2. El receptor $A_{2A}$ de adenosina

El gen humano del receptor  $A_{2A}$  se encuentra en el cromosoma 22q11.2 y contiene dos exones interrumpidos por un único intrón de 7 kb entre las regiones que codifican los



dominios transmembrana III y IV (Peterfreund et ál., 1996). Con 410 aminoácidos, es el receptor más largo de la familia de receptores de adenosina, característica que se debe principalmente a la extensa cola C-terminal (Fig. 4). Respecto a su distribución en el sistema nervioso central, se encuentra altamente expresado en el estriado, tanto dorsal como ventral, y el bulbo olfatorio, y en niveles menores en corteza, amígdala, hipocampo, hipotálamo, tálamo y cerebelo (Fig. 5) (Hettinger et ál., 2001; Rosin et ál., 2003; Rebola et ál., 2005). En los tejidos periféricos, este receptor se expresa también en bazo, timo, corazón, pulmones, riñones, leucocitos y plaquetas (Moreau y Huber, 1999).

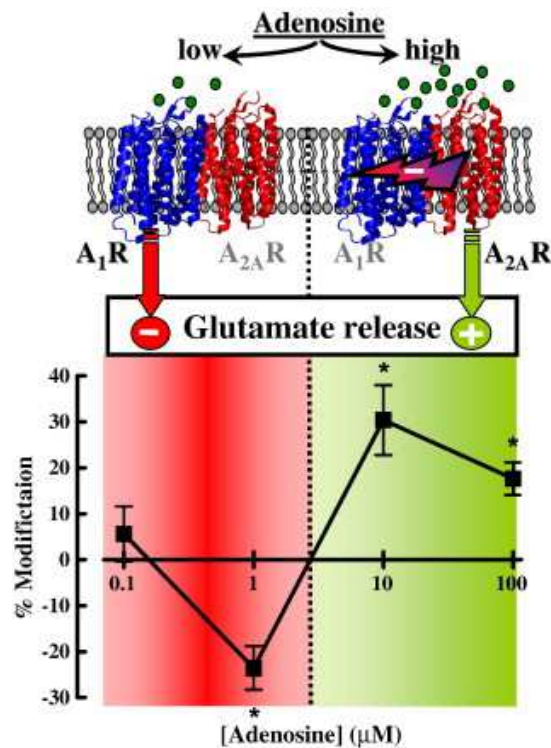
La vía de transducción de señal usada por A<sub>2A</sub>R depende de la activación de la adenilato ciclasa, mediante G<sub>s</sub>. La relativa deficiencia de este tipo de proteínas en el estriado favorece que este receptor señalice en esta región del cerebro por activación de Golf (Fredholm et ál., 2000; Kull et ál., 2000). En ambas situaciones se produce una generación de AMPc, que activa la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), que a su vez regula el estado de fosforilación de varias proteínas sustrato. Uno de estos sustratos es DARPP-32, que se convierte en un potente inhibidor de la proteína fosfatasa-1 (PP-1), inhibidora de la actividad de la proteína CREB (proteína de unión elementos de respuesta a AMPc) (Nishi et ál., 2000). Así, la estimulación del receptor A<sub>2A</sub> lleva a la inducción de la expresión de genes modulados por CREB, como los de *c-fos*, pre-proencefalina y neurotensina (Karcz-Kubicha et ál., 2006). Además de la señalización preferencial vía G<sub>s/olf</sub>, se ha demostrado que A<sub>2A</sub>R también utiliza otras vías de segundos mensajeros, incluyendo PLC (Wirkner et ál., 2000), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt y MAPK (Seidel et ál., 1999; Schulte y Fredholm, 2003; Canals et ál., 2005).

### 3. OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR A<sub>2A</sub>R CON OTROS GPCR

#### 3.1. *El receptor A<sub>1</sub> de adenosina*

Se ha demostrado que la unión de un ligando específico a un receptor en un dímero puede alterar la unión de un ligando específico para el receptor vecino, sugiriendo un posible mecanismo donde un ligando modula la eficacia y/o potencia de otro ligando. Un caso especialmente interesante es el heterodímero formado por los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> de adenosina, que colocalizan e interaccionan en la membrana presináptica de

neuronas glutamatérgicas que conectan la corteza con el estriado. En este oligómero, la estimulación del receptor  $A_{2A}$  disminuye enormemente la afinidad del receptor  $A_1$  por su agonista e inhibe la señalización (Ciruela et ál., 2006). Teniendo en cuenta que la afinidad por la adenosina del receptor  $A_1$  es mayor que la que muestra el receptor  $A_{2A}$ , en este heterómero  $A_1/A_{2A}$  cuando la concentración de adenosina es pequeña el neuromodulador se une al receptor  $A_1$  inhibiendo la liberación de glutamato en el estriado (Fig. 6). Cuando la concentración de adenosina es elevada, por ejemplo en casos de hipoxia, la adenosina se une también al receptor  $A_{2A}$  provocando en el heterómero la inhibición farmacológica y funcional del receptor  $A_1$ . En estas condiciones la adenosina señala únicamente por  $A_{2A}$  estimulando la liberación de glutamato en el estriado (Ciruela et ál., 2006). El heterómero  $A_1/A_{2A}$  actúa como un interruptor mediante el cual, según sea la concentración de adenosina en el medio, se produce la inhibición o la estimulación de la liberación de glutamato en el estriado (Ciruela et ál., 2006).



**Figura 6.** El heterodímero  $A_1/A_{2A}$ . Representación esquemática de los efectos dependientes de la concentración de adenosina en la liberación de glutamato. La activación del receptor  $A_{2A}$  provoca una inhibición de la funcionalidad del receptor  $A_1$  mediante interacciones intramembrana. (Extraído de Ciruela et ál., 2011)

### 3.2. El receptor $D_2$ de dopamina

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el SNC, donde controla una gran variedad de funciones, incluyendo las actividades motora y endocrina, la modulación sensorial, aprendizaje, memoria, emotividad, afectividad o motivación (Missale et ál., 1998).

El receptor  $D_2$  de dopamina ( $D_2R$ ) forma parte del subgrupo *D<sub>2</sub>-like* de receptores para este neurotransmisor. Los miembros de esta subcategoría se caracterizan por unirse a la proteína  $G_{\alpha i}$  (inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa) y por poseer un tercer bucle intracelular muy largo (Missale et ál., 1998). Una isoforma del receptor que carece de este bucle (la forma *short*,  $D_{2S}R$ ) actúa como autorreceptor en los terminales dopaminérgicos, donde regula la síntesis y liberación de dopamina (Mercuri et ál., 1997). Anatómicamente,  $D_2R$  se encuentra principalmente en núcleo accumbens, tubérculo olfatorio e hipocampo, tanto pre- como postsinápticamente, y su expresión es elevada en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Es en este tipo neuronal donde se ha observado un alto grado de codistribución entre  $D_2R$  y  $A_{2A}R$  en la región perisináptica de la membrana postsináptica (Rosin et ál., 1998).

Aunque ya se había sugerido una interacción antagonica entre receptores de adenosina y dopamina en modelos animales (Fuxe y Ungerstedt, 1974), no fue hasta el desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas durante el siglo XXI que la interacción física entre  $A_{2A}R$  y  $D_2R$  se pudo confirmar. Así, fue mediante experimentos de BRET y FRET en células in vivo como se obtuvieron las evidencias de la interacción  $A_{2A}R$ - $D_2R$  (Canals et ál., 2003; Kamiya et ál., 2003), determinándose además algunos determinantes estructurales relevantes para el proceso de dimerización, como los dominios transmembrana 5 y 6 junto al bucle intracelular 3 de  $D_2R$ , y el dominio transmembrana 4 junto a la cola C-terminal de  $A_{2A}R$ . Además, se pudo ver que las interacciones entre bucle IC3 de  $D_2R$  y el extremo citoplasmático de  $A_{2A}R$  eran de tipo electrostático entre residuos básicos del primero con aminoácidos ácidos del segundo (Ciruela et ál., 2004).

Cabe destacar además la importancia del oligómero  $A_{2A}R$ - $D_2R$  en la enfermedad de Parkinson. Los antagonistas de  $A_{2A}R$  bloquean la acción de la adenosina endógena sobre el heterómero, lo que provoca un aumento en la señalización mediada por  $D_2R$ , además de disminuir la señalización inducida por esa adenosina endógena (Ferré et ál., 1991; Fuxe et ál., 2007). Así pues, se ha propuesto el tratamiento combinado de L-DOPA y antagonistas de  $A_{2A}R$ , ya que estos parecen potenciar las acciones

antiparkinsonianas de la L-DOPA, tanto en modelos animales (Kanda et ál., 1998; 2000) como en pacientes de esta enfermedad (Bara-Jiménez et ál., 2003; Hauser et ál., 2003; ensayos clínicos de fase II y III).

### 3.3. *El receptor metabotrópico 5 de glutamato*

El glutamato es el principal neurotransmisor en el SNC y sus acciones están mediadas por receptores ionotrópicos, que forman canales iónicos, y metabotrópicos, un subtipo de GPCR del que se conocen ocho miembros. Por su homología de secuencia, mGlu<sub>5</sub>R forma parte del grupo I de estos receptores metabotrópicos y se caracteriza por acoplarse a la proteína G<sub>q</sub>, que mediante la activación de la fosfolipasa C provoca un aumento de los niveles de IP<sub>3</sub> que llevan a la liberación de calcio en el citosol, proveniente de reservorios intracelulares.

Este receptor se encuentra principalmente en el SNC, presentando una localización postsináptica y preferencialmente en la región perisináptica adyacente a la densidad postsináptica (Smith et ál., 2000). A través de proteínas de andamiaje (v.g. Homer, PSD-95) se pueden conectar físicamente a receptores ionotrópicos de glutamato, de manera que se producen interacciones entre estos dos tipos de receptores del mismo neurotransmisor (Kennedy, 2000; Pisani et ál., 2001). Además, mGlu<sub>5</sub>R también está involucrado en la plasticidad sináptica a través de procesos de *long-term potentiation* (LTP) y *long-term depression* (LTD) (Conquet et ál., 1994; Lu et ál., 1997).

A partir de experimentos de codetección y coimmunoprecipitación (Ferré et ál., 2002), se postuló la interacción entre A<sub>2A</sub>R y mGlu<sub>5</sub>R, dado el alto grado de codistribución de ambos receptores tanto en células cotransfectadas, como en cultivos primarios de neuronas estriatales (Fuxe et ál., 2003) o terminales nerviosas glutamatérgicas de estriado (Rodrigues et ál., 2005). De hecho, se ha observado una relación sinérgica entre antagonistas de A<sub>2A</sub>R y mGlu<sub>5</sub>R a nivel de expresión de c-fos y de fosforilación de las proteínas ERK y DARPP-32. Esta sinergia también se ha observado en la estimulación de neuronas aferentes estriatales. Así, se ha demostrado un gran incremento en la liberación de GABA desde neuronas estriatopalidales tras una coperfusión local en núcleo accumbens de agonistas de A<sub>2A</sub>R y mGlu<sub>5</sub>R (Diaz-Cabiale et ál., 2002).

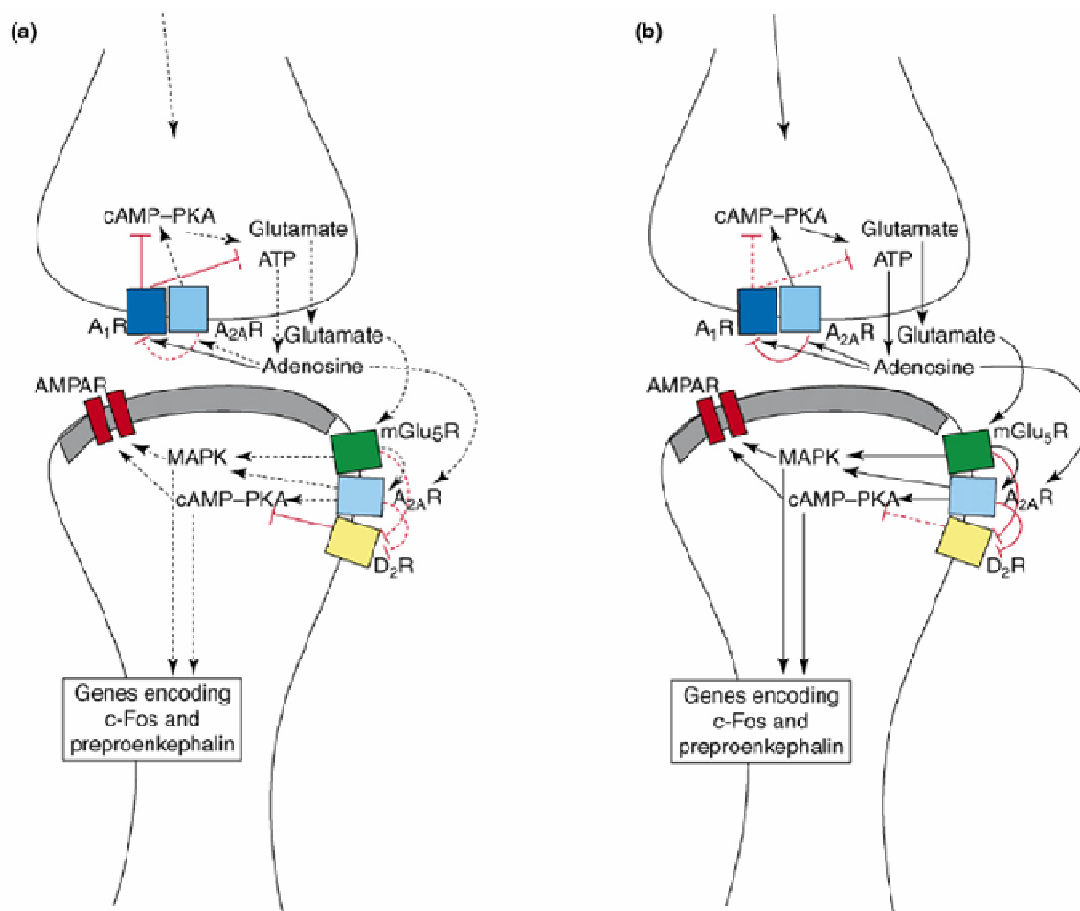
### 3.4. El oligómero $A_{2A}R/D_2R/mGlu_5R$

A raíz de las interacciones observadas entre  $A_{2A}R$  con  $D_2R$  y  $mGlu_5R$  en los apartados anteriores y considerando la colocación de los tres receptores en la misma región perisináptica de la sinapsis glutamatérgica, la posible formación de un heterotrímero con estos GPCR ha ido cobrando lentamente mayor interés. Si bien hasta la publicación de datos obtenidos en parte durante la elaboración de esta Tesis (Cabello et ál., 2009) no existían evidencias de una interacción física entre estos receptores, otras evidencias ya habían abierto esta nueva hipótesis.

Por una parte, la disminución de la afinidad de  $D_2R$  por sus ligandos inducida por agonistas tanto de  $A_{2A}R$  (Ferré et ál., 1991) como de  $mGlu_5R$  (Popoli et ál., 2001) en preparaciones de estriado de rata, contrastó con el efecto obtenido por una coadministración de los mismos agonistas. En estas condiciones, se produjo una disminución sinérgica de esa afinidad, siendo de mayor efecto que la de la suma de cada agonista por separado (Popoli et ál., 2001).

Resultados similares se obtuvieron en experimentos de comportamiento animal. Así, la actividad motora de ratones con la transmisión dopaminérgica reducida se vio afectado de manera sinérgica por la coadministración de antagonistas de  $A_{2A}R$  y  $mGlu_5R$  (Kachroo et ál., 2005). Además, en ratas con una lesión por 6-hidroxidopamina en uno de sus estriados, el movimiento rotatorio inducido por un agonista de  $D_2R$  se vio contrarrestado tanto por agonistas de  $A_{2A}R$  como de  $mGlu_5R$ , y con un efecto sinérgico también al coadministrar ambos (Popoli et ál., 2001).

Así pues, el oligómero  $A_{2A}R/D_2R/mGlu_5R$  estaría cumpliendo un papel de procesador de las diferentes señales, que junto al control de la transmisión glutamatérgica por el oligómero  $A_1/A_{2A}$  a nivel presináptico, proporcionaría una respuesta concertada a nivel postsináptico (Fig. 7). En condiciones de un bajo número de inputs en el estriado, las bajas concentraciones de adenosina y glutamato favorecerían la señalización prevalente de  $D_2R$ , de manera que se inhibiría la adenilato ciclasa y, en último término, la expresión de genes como *c-fos*. Por el contrario, en condiciones de llegada de una fuerte señalización a esta región estriatal haría prevalecer la acción sinérgica de adenosina y glutamato, favoreciendo las vías reguladas por PKA y MAPK y promoviendo la fosforilación de sustratos como el receptor de AMPA y activando la transcripción génica (Ferré et ál., 2007a).



**Figura 7.** El heterodímero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R. Representación esquemática de la sinapsis glutamatergica entre neuronas corticoestriales y estriatopallidales. Dependiendo de si las concentraciones extracelulares de adenosina y glutamato son bajas (a) o altas (b), la señalización por segundos mensajeros a nivel postsináptico estará inhibida o activada. (Extraído de Ferré et ál., 2007b)

Cabe destacar la importancia de este tipo de oligómeros también en situaciones patológicas. Así, en la enfermedad de Parkinson se produce la pérdida de neuronas nigroestriales dopaminérgicas que conectan también con estas neuronas GABAérgicas estriatopallidales. El desequilibrio entre neurotransmisores que conlleva esa muerte neuronal termina por provocar las alteraciones a nivel motor que caracterizan a la enfermedad. Por esta razón, se ha intentado compensar indirectamente la pérdida de señalización mediada por D<sub>2</sub>R. Así, se ha postulado el uso de antagonistas de A<sub>2A</sub>R (Schwarzschild et ál., 2002) y mGlu<sub>5</sub>R (Kachroo et ál., 2005) como terapia complementaria al uso de agonistas D<sub>2</sub>R en el tratamiento de los síntomas del párkinson.

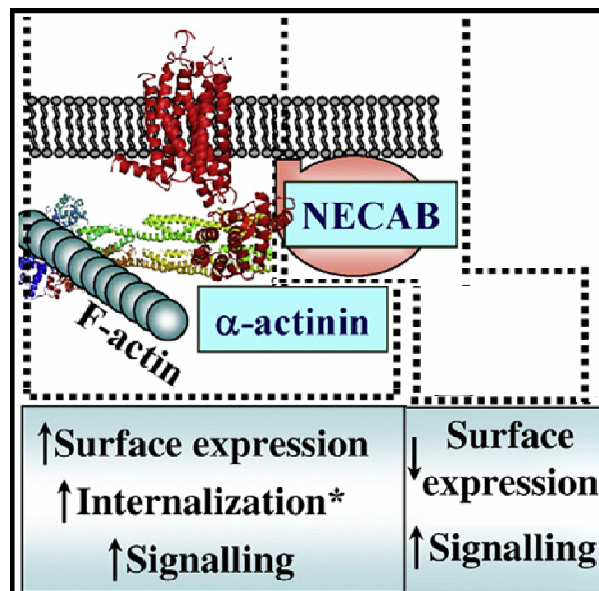
#### 4. INTERACCIÓN DE A<sub>2A</sub>R CON OTRAS PROTEÍNAS

Como hemos visto, la interacción entre diferentes GPCR tiene consecuencias funcionales que influyen en la señalización final de estos receptores. Sin embargo, existen muchas otras proteínas que pueden interactuar con estos receptores y que afectan a muchas de sus características (v.g. expresión en la membrana plasmática, señalización, internalización). En el caso de A<sub>2A</sub>R, la larga cola C-terminal de 122 aminoácidos del receptor resulta en una región con un mayor número de sitios de interacción que otros miembros de la familia de receptores de adenosina. Así, aplicando este dominio citoplasmático de A<sub>2A</sub>R como anzuelo en ensayos de doble híbrido, se han identificado diversas proteínas con capacidad de unión a A<sub>2A</sub>R (revisadas en Ciruela et ál., 2010) y de las que destacamos algún ejemplo a continuación.

##### 4.1. *α-actinina*

Se ha descrito que el receptor A<sub>2A</sub>R se ancla al citoesqueleto de actina a través de la interacción con la proteína *α-actinina*, que regula el tráfico del receptor desde la membrana plasmática (Burgueño et ál., 2003) (Fig. 8). Esta proteína, descubierta hace más de 40 años, está formada por dos cadenas peptídicas que unen de manera paralela dos filamentos de actina, jugando en consecuencia un papel clave en la formación de estructuras del citoesqueleto en diversos tipos celulares (Maruyama y Ebashi, 1965). Cada monómero de esta molécula contiene tres dominios funcionalmente diferenciados: el extremo N-terminal contiene dos dominios de homología a calponina (CH) que median en la interacción con la actina, cuatro motivos *spectrin-like* (SPEC) en la zona central y dominios *EF-hand* (EFH) en el extremo C-terminal que confieren a la proteína sensibilidad a calcio en la unión a F-actina para algunas de las isoformas (en concreto, *α-actinina-1* y *α-actinina-4*). Es interesante poner de relevancia esta proteína como enlace entre el citoesqueleto y una multitud de otros elementos celulares, ejerciendo un papel regulador mediante el direccionamiento a localizaciones subcelulares específicas o dominios de membrana plasmática con una particular funcionalidad. En concreto, se ha podido observar su interacción con multitud de receptores de membrana plasmática como los receptores de NMDA (Dunah et ál., 2000) y metabotrópico de glutamato de tipo 5 (Cabello et ál., 2007). En el caso del receptor de NMDA, además de regular

directamente la probabilidad de encontrar el canal abierto (Rycroft y Gibb, 2004), esta interacción con  $\alpha$ -actinina se ha detectado en regiones del estriado de rata donde hay una alta concentración de  $A_{2A}R$ . Así, se ha observado que la estimulación de este receptor produce una inhibición en las corrientes mediadas por NMDA y que esta regulación se evita utilizando un agente despolimerizador del esqueleto de actina (citocalasina B) (Wirkner et ál., 2000). Esta dependencia  $A_{2A}R/\alpha$ -actinina se corroboró también usando una forma truncada del receptor carente del sitio de unión a la proteína de citoesqueleto. En estas condiciones, el estímulo por agonista de  $A_{2A}R$  no produjo ni el agregamiento del receptor en la membrana plasmática ni su internalización mediada por  $\beta$ -arrestina, sugiriéndose por lo tanto un papel clave de la unión al citoesqueleto vía  $\alpha$ -actinina en la funcionalidad de este GPCR (Burgueño et ál., 2003) (Fig. 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la interacción de  $\alpha$ -actinina y NECAB2 con  $A_{2A}R$  y sus consecuencias funcionales sobre el receptor. La estructura de  $A_{2A}R$  y  $\alpha$ -actinina fueron obtenidas en el RCSB (PDB ID : 3eml y 1sjj, respectivamente). \*: Necesario para la internalización (Extraído y modificado de Ciruela et ál., 2010)

#### 4.2. Proteína neuronal de unión a calcio 2 (NECAB2)

Más recientemente, se ha demostrado también la interacción de  $A_{2A}R$  con NECAB2, uno de los miembros de una familia de proteínas neuronales que unen calcio y que comparten ciertos elementos estructurales (Canela et ál., 2007). Entre estos destacan una región central de homología NECAB (NHR) y un motivo ABM en el extremo C-terminal, ambos con funciones aún por determinar un dominio, así como un dominio *EF-hand* en el extremo N-terminal para la unión de calcio (Burgoyne, 2007). De manera



## Introducción

interesante, se pudo comprobar mediante experimentos de *pull-down* que la interacción A<sub>2A</sub>R/NECAB2 se veía inhibida al aumentar la concentración de iones calcio. Cabe destacar por lo tanto que muchas de estas interacciones se producen transitoriamente, en consonancia con el estado fisiológico de las células.

Aunque también se detectó la codistribución en estriado de rata de A<sub>2A</sub>R y NECAB2, las consecuencias funcionales de la interacción fueron diferentes a las de  $\alpha$ -actinina. Por una parte, la coexpresión en cultivos celulares de ambas proteínas afectó a los niveles de A<sub>2A</sub>R en membrana plasmática, reduciéndose en un 25%; en cambio, en las mismas condiciones la internalización del receptor mediada por agonista fue inhibida y, además, la señalización mediada por el receptor (fosforilación de ERK1/2) aumentó (Fig. 8). Cabe destacar también que existe una segunda isoforma de NECAB2, llamada NECAB2S, causada por un inicio de traducción alternativo que da lugar a una forma más corta de la proteína (39 kDa, en comparación con los 43 kDa de NECAB2). A pesar de carecer de 37 aminoácidos en el extremo N-terminal (que no formaban parte del dominio *EF-hand*), NECAB2S también presentó capacidad de unión a la cola C-terminal de A<sub>2A</sub>R (Canela et ál., 2007).

## **OBJETIVOS**



Globalmente, los objetivos de esta Tesis Doctoral se centran en el receptor de adenosina  $A_{2A}$ , con la intención de identificar mejor las interacciones en las que participa y que determinan finalmente su funcionalidad real.

Como se ha descrito, los receptores acoplados a proteína G tienen la capacidad de formar dímeros, resultando en complejos que modifican, regulan y amplían los mecanismos por los que estos receptores señalizan y responden a sus correspondientes ligandos. Además, la coincidencia de varios de estos complejos diméricos en las mismas regiones, junto a la confluencia de sus vías de señalización ha sugerido fuertemente la existencia de complejos de mayor orden. Con estos precedentes, nos propusimos nuestros primeros objetivos:

**Objetivo 1:** Identificar en células vivas la formación de dímeros del receptor de adenosina  $A_{2A}$  mediante BiFC y, en combinación con la técnica de BRET, determinar la existencia de oligómeros de  $A_{2A}R$  de más de dos miembros mediante esta nueva aproximación metodológica.

**Objetivo 2:** Utilizar la combinación BRET-BiFC para la identificación de oligómeros  $A_{2A}R/D_2R/mGlu_5R$  en células vivas.

Por otra parte, además del estudio de la interacción entre GPCR, también cabe dilucidar la interacción con otras proteínas que pueden mediar la localización y funcionalidad de estos receptores. Sin embargo, las aproximaciones empleadas para el descubrimiento de estos elementos (e.g. pull-downs, doble híbrido clásico) han sido hasta el momento de un valor relativo, dadas sus limitaciones técnicas. Así, el uso de fragmentos concretos de la secuencia peptídica de  $A_{2A}R$  reduce los posibles lugares de interacción con los que reconocer nuevas proteínas; además, la necesidad técnica de que estos fragmentos sean solubles supone alejar de la membrana plasmática al sistema de detección, perdiéndose el contexto fisiológico real de las interacciones.

En base a estas consideraciones, nos planteamos los dos siguientes objetivos:

**Objetivo 3:** Aplicar el ensayo de doble híbrido de membrana (MYTH), que permite utilizar el receptor completo y en su localización natural en la membrana, en la identificación de nuevas proteínas interaccionantes con el receptor  $A_{2A}$  de adenosina.

**Objetivo 4:** Validar la interacción con el receptor  $A_{2A}$  de adenosina de candidatos identificados por MYTH, determinando la relevancia funcional y las características estructurales asociadas a esta interacción.

## **METODOLOGÍA**



La mayoría de resultados de esta Tesis han podido ser publicados y sus correspondientes secciones de Materiales y Métodos se encuentran detalladas en los anexos indicados. En este apartado queremos destacar algunas de las metodologías en concreto, dada su especial relevancia o por considerar que requieren una descripción más detallada.

## 1. MÉTODOS DE ESTUDIO DE INTERACCIÓN ENTRE GPCR BASADOS EN FLUORESCENCIA Y LUMINISCENCIA

### *1.1. Transferencia de energía de resonancia por bioluminiscencia (BRET)*

El principio básico de la transferencia de energía de resonancia (RET) consiste en la transmisión de esta energía desde un cromóforo en estado excitado (el “donador”) a una molécula “aceptora” (Wu y Brand, 1994). En el caso del BRET, el donador consiste en una enzima que cataliza un sustrato que se vuelve bioluminiscente. Como resultado de esta interacción, se produce una disminución en la emisión del donador y un consecuente aumento de fluorescencia del aceptor. La eficiencia de esta transferencia de energía (E) es inversamente proporcional a la distancia entre donador y aceptor (R) elevada a la sexta potencia (Förster, 1948; Stryer y Haugland, 1967):

$$E = 1 / (1 + R^6 / R_0^6)$$

donde  $R_0$  es la distancia que proporciona un 50% de la transferencia de energía entre donador y aceptor.  $R_0$  normalmente comprende entre 2 y 6 nm, siendo por debajo de los 10 nm el rango efectivo para que exista RET. Cabe destacar aquí que esta distancia abarca las dimensiones habituales de muchas proteínas y es similar a la descrita para complejos multiméricos observados en sistemas biológicos (Sheng y Hoogenraad, 2007). Otros factores que condicionan la transferencia de energía son la orientación entre donador y aceptor, la vida media de emisión del donador y, finalmente, el solapamiento espectral entre las longitudes de emisión del donador y de excitación del aceptor (Förster, 1948; Stryer y Haugland, 1967).

En la aproximación por BRET, la enzima donadora usada típicamente es la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc), que genera bioluminiscencia catalizando la transformación de un sustrato en presencia de oxígeno. En este caso, el espectro de emisión del donador



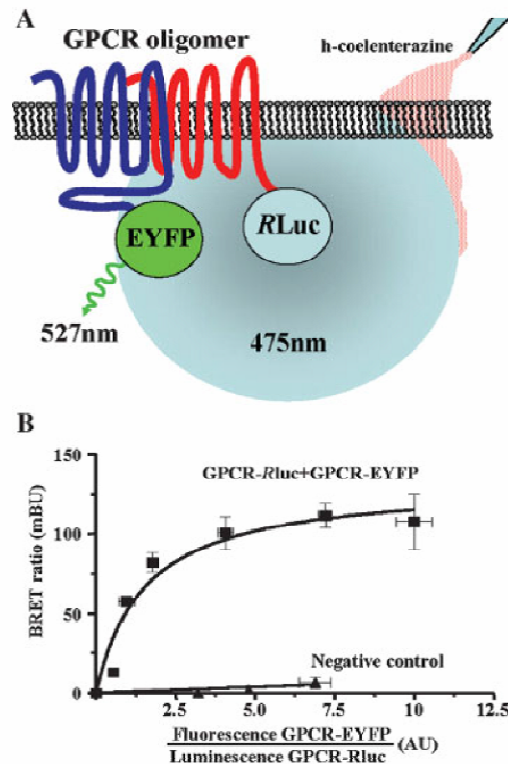
depende de manera directa del sustrato utilizado (Tabla 1) y el grado de solapamiento con el aceptor determinará la intensidad de la señal de BRET.

Tabla 1. Combinaciones clásicas de sustratos de *Rluc* y moléculas aceptoras en ensayos de BRET. Se destacan también las longitudes de onda de excitación y emisión correspondientes. (Extraído de Gandía et ál., 2008)

<b>BRET</b>				
<b>Donor (<i>Rluc</i> enzyme)</b>		<b>Acceptor</b>		
<b>Substrate</b>	<b>Em. (nm)</b>		<b>Ex. (nm)</b>	<b>Em. (nm)</b>
h-Coelenterazine (BRET <sup>1</sup> )	~475	<i>EYFP</i>	~513	~527
DeepBlueC (BRET <sup>2</sup> )	~395	<i>GFP<sup>2</sup></i>	~395 <sup>§</sup>	~510

En nuestro caso, la combinación utilizada para los experimentos de BRET fue el sustrato coelenterazina-h como donador y la proteína YFP como aceptor. Así, la emisión a 475 nm generada por el sustrato tiene la capacidad de excitar parcialmente a la YFP, que emitirá a su vez en una longitud de onda de 527 nm. Si bien en estas condiciones la señal de BRET obtenida suele ser alta, el alto grado de solapamiento entre las emisiones del donador y el aceptor requiere un análisis cuidadoso de los resultados (Milligan y Bouvier, 2005).

Con estas consideraciones, en la generación de curvas de BRET en cultivos celulares se realizan diversas transfecciones en las que se mantiene una cantidad constante del GPCR donador y se expresan cantidades crecientes del GPCR aceptor (i.e. fusionados a *Rluc* y YFP, respectivamente, Fig. 9A). Al incubar cantidades equivalentes de cada una de estas muestras con el sustrato coelenterazina-h, se miden las emisiones a 527 y 475 nm y el ratio entre ambas es la señal de BRET que se representará. Para compensar el solapamiento comentado entre la emisión de coelenterazina-h y YFP, uno de los puntos en estos ensayos lleva solamente la construcción con *Rluc*, de manera que el ratio de BRET obtenido en estas condiciones se sustraerá en el resto de muestras.



**Figura 9.** A) Representación esquemática del fenómeno de BRET durante la interacción de dos GPCR. El sustrato coelenterazina-h se añade al medio y es capaz de atravesar la membrana plasmática, alcanzando a la proteína RLuc. La catalización del sustrato produce bioluminiscencia a 475 nm, que excita la proteína YFP para que se produzca una emisión a 527 nm. B) Aspecto típico de una curva de saturación de BRET. (Extraído de Gandía et ál., 2008)

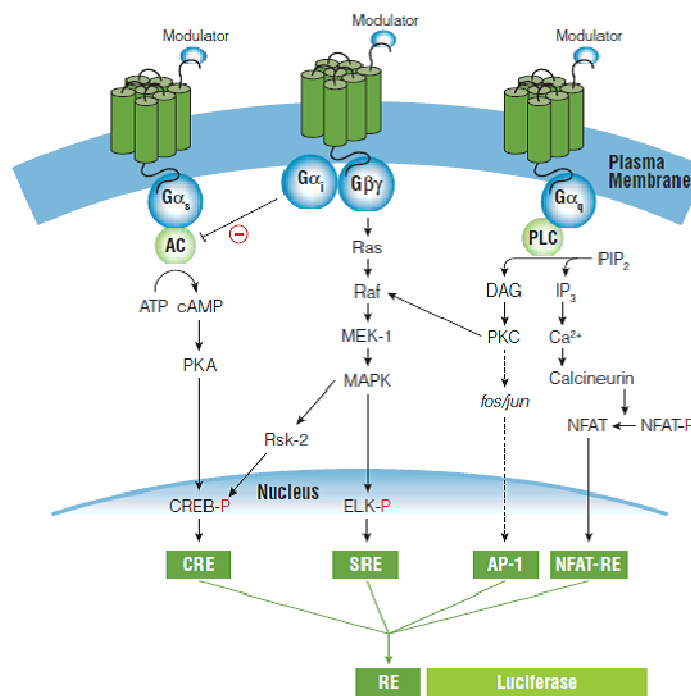
A continuación, los ratios de BRET se representan en función de la fluorescencia total, obtenida por la excitación directa del aceptor, normalizada con la luminiscencia del donador (Fig. 9B). El ajuste de los datos a una curva hiperbólica saturable denotará que la interacción detectada es específica. Además, es necesario realizar experimentos similares sustituyendo uno de los GPCR por una proteína control que, idealmente, será otro GPCR que no interaccione, obteniéndose en ese caso señales de BRET mucho menores y que se ajustarán a una línea recta (Fig. 9B).

### 1.2. Estudio de la funcionalidad de GPCR por luciferasa como gen reportero

Una alternativa de sencilla implementación para el estudio de variaciones en la señalización provocada por la interacción de receptores y mediada por proteína G es el uso de genes reporteros. En concreto, el gen de la luciferasa ofrece la especial ventaja de no tener actividad endógena, así como su sensibilidad y amplio rango dinámico (Fan y Wood, 2007). Así, utilizamos un sistema dual de luciferasas (Rluc y la luciferasa de

luciérnaga, luc2) para evaluar esas variaciones en cultivos celulares con transfecciones transitorias. El gen luc2 se encuentra en vectores controlados por elementos de respuesta específicos a cada cascada de señalización (Fig. 10), mientras que el vector con *Rluc* no se encuentra bajo ninguna regulación específica y se usará en la normalización de los resultados.

En los experimentos descritos en la sección de resultados, se monitorizó la generación de AMPc y de calcio intracelular, por lo que los vectores utilizados fueron pGL4-CRE-luc2p y pGL4-NFAT-luc2p (Promega), respectivamente. Así, estos vectores fueron transfectados en cantidades equimolares con el GPCR o combinación de GPCR a evaluar, mientras que el vector de *Rluc* se añadió en una proporción 20 veces menor.



**Figura 10.** Esquema de las diversas vías de señalización mediadas por los diferentes tipos de proteínas G. En la parte inferior se destacan los elementos de respuesta correspondientes a cada vía y que pueden usarse como promotores de la expresión del gen de la luciferasa. CRE: elemento de respuesta a AMPc; SRE: elemento de respuesta a suero; AP-1: proteína activadora-1; NFAT-RE: elemento de respuesta al factor nuclear de células T activadas. (Extraído de [www.promega.com](http://www.promega.com))

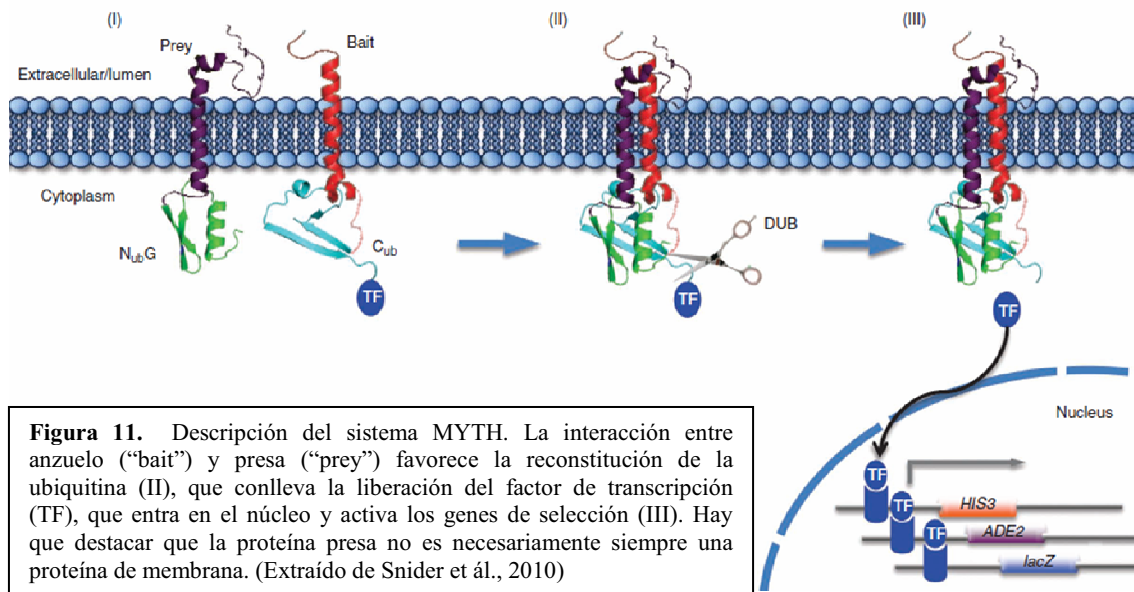
36 horas después de la transfección, las muestras de cada experimento se incubaron con los ligandos indicados durante 4 o 17 horas, dependiendo de si se evaluaba el efecto en el AMPc o el calcio, respectivamente. Tras este periodo, las células se lavaron con tampón HBSS, se resuspendieron con este mismo tampón y se sembraron en placas blancas de 96 pocillos. Allí, se añadió por una parte una mezcla de tampón de lisis y sustrato de la luciferasa luc2 (BrightGlo, Promega) para cuantificar el nivel de expresión génica inducido, captando la emisión a 535 nm. Paralelamente, se midió la

cantidad de *Rluc* expresada mediante la adición de coelenterazina-h 5  $\mu$ M (Nanolight), captando la señal a 475 nm, calculando finalmente los ratios luc2p:*Rluc* para cada condición experimental.

## 2. DETECCIÓN DE LAS INTERACCIONES DE GPCR CON OTRAS PROTEÍNAS MEDIANTE EL ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO DE MEMBRANA (MYTH)

### 2.1. Principio básico

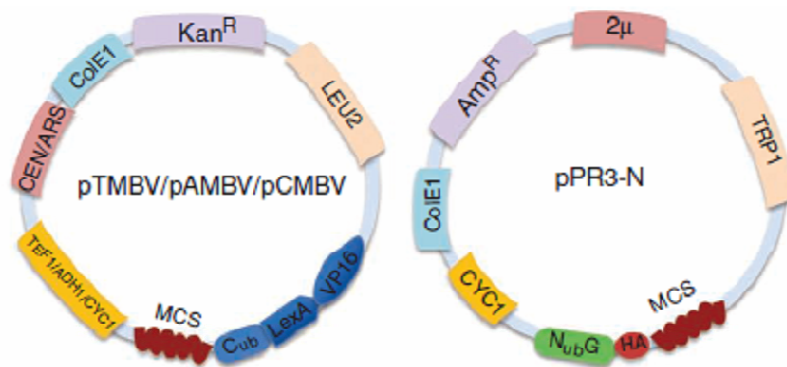
El sistema MYTH se basa en el concepto de la “ubiquitina partida”, la observación que esta proteína, que sirve de marca para otras proteínas que deben ser dirigidas a la degradación por el proteasoma, se puede dividir en dos mitades. El fragmento N-terminal (llamado NubI) y el C-terminal (Cub) son capaces de reasociarse espontáneamente in vivo para formar una pseudo-ubiquitina completa. Esta complementación espontánea puede ser bloqueada por una mutación puntual de la isoleucina 13 en una glicina (obteniéndose el fragmento NubG) (Johnsson y Varshavsky, 1994). Este principio se ha aplicado a la metodología de doble híbrido como un sensor de interacciones proteína-proteína (Fig. 11). Así, la fusión de Cub por su extremo C-terminal a la proteína de membrana de interés (en nuestro caso, los GPCR) en el extremo citoplasmático de la misma se usó como “anzuelo” para detectar las interacciones. Además, Cub se presenta a su vez fusionado a un factor de transcripción (TF) compuesto por el dominio de unión a ADN LexA, de *Escherichia coli*, y el dominio de activación transcripcional del herpesvirus simplex VP16. De manera similar, los candidatos a interactuar con el anzuelo (ya sean proteínas conocidas u originadas en una librería de ADNc) se incorporan a un vector “presa” que les fusiona el fragmento NubG en uno de los extremos. Al coexpresar vector y presa en la cepa de levadura apropiada, si se produce una interacción entre ambas permite el acercamiento de Cub y NubG, reconstituyéndose la ubiquitina. Esta proteína a su vez es reconocida por las enzimas desubiquitinantes (DUB), una clase de proteasas que hidrolizan el enlace amida que une el extremo C-terminal de la ubiquitina y la proteína de interés. Esta rotura lleva a la liberación del TF, que entra en el núcleo y activa la expresión los genes de selección, que se encuentran bajo el control de sitios de unión a LexA (Fig. 11).



## 2.2. Cepas de levadura, vectores y medios de selección

Para poder llevar a cabo un cribado de proteínas que distinga las interacciones entre anzuelo y presa, es necesaria la correcta combinación de cepa de levadura y vectores con sus correspondientes medios de selección. Así, en nuestra aplicación del método MYTH trabajamos con la cepa de *S. cerevisiae* THY.AP4 (*MATa leu2, ura3, trp1::(lexAop)-lacZ (lexAop)-HIS3 (lexAop)-ADE2*) y los vectores pTMBV y pPR3-N para anzuelo y presa, respectivamente (Fig. 12).

En estas condiciones, el medio selectivo para confirmar la correcta transformación de los vectores anzuelo y presa consistió en un medio sintético (SD) para levadura preparado con todos los aminoácidos excepto triptófano y leucina (SD-WL), dado que los genes que palían estas carencias se encuentran en los propios vectores (Fig. 12). En el caso del medio selectivo para detectar interacciones positivas, se utilizó el mismo SD en ausencia de triptófano, leucina, adenina e histidina, y en presencia de X-Gal (SD-WLAH + X-Gal), dado que la expresión de los genes HIS3, ADE2 y lacZ se encuentra bajo el control de LexA.



**Figura 12.** Vectores utilizados en el cribado por MYTH. En el sitio de multiclonaje (MCS) se introducen las secuencias correspondientes a la proteína anzuelo de interés (en el caso del vector pTMBV) o los elementos presa que componen las librerías de ADNc (en el caso de pPR3-N). (Extraído de Snider et ál., 2010)

### 2.3. Proceso de cribado

Para poder considerar que los GPCR a evaluar eran candidatos viables al proceso de MYTH, el paso inicial fue validar la construcción anzuelo (GPCR-Cub-TF) mediante el test NubG/I. Así, se transformó este vector junto a proteínas control fusionadas a los fragmentos NubG o NubI, proporcionando dos proteínas de control positivo y dos de control negativo. En concreto se usaron las proteínas Ost1, componente del complejo oligosacaryltransferasa del retículo endoplasmático (Kelleher y Gilmore, 1994) y Fur4, una uracil permeasa localizada en la membrana plasmática (Chevallier, 1982). Así, la cotransformación con las proteínas fusionadas a NubI permitió el crecimiento de las levaduras en medio selectivo, mientras que el caso opuesto sucedió al usar las formas fusionadas a NubG. De esta manera, se ha podido confirmar que el anzuelo se expresaba correctamente y que el sistema era activable, tanto en membrana plasmática como en retículo endoplasmático, pero que esta activación no se producía de manera espontánea al usar la forma NubG, lo que demuestra una necesidad de especificidad en la interacción, dado que es esta versión de Nub la que se usó en el cribado.

Con el anzuelo validado, se pudo realizar el cribado de una librería de ADNc para identificar posibles proteínas interaccionantes. En nuestro caso, utilizamos una librería originada a partir del RNAm de cerebro fetal humano, cedida por cortesía del Dr. Igor Stagljjar. Las colonias crecidas en medio sólido de selección para la interacción anzuelo-presa fueron cribadas por su tamaño e intensidad de la coloración azul (producida por la hidrólisis de X-Gal) y las que superaron esta selección se crecieron en medio líquido de selección para el crecimiento solo del vector presa (SD-W), para amplificarlo y

purificarlo mediante los habituales kits de mini-prep (Promega). El ADN obtenido fue secuenciado utilizando un *primer* interno de la secuencia de NubG con el que detectar los nucleótidos a 3' de esta (NubGFwd: 5'-CCGATACCATCGACAACGTTAAGTCG-3'). Las secuencias obtenidas se analizaron por BLAST para determinar los genes que codificaban. Finalmente, mediante un test de dependencia de anzuelo (*bait dependency test*; Snider et ál., 2010) se determinó la especificidad de la interacción entre el anzuelo y las secuencias-presa, cotransformando en paralelo con un anzuelo-control no relacionado, que en estos experimentos fue la proteína de membrana de riñón kAE1 (*kidney anion exchanger 1*) y descartando las interacciones positivas para este anzuelo-control.

### 3. ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD MOTORA EN RATONES

#### 3.1. *Movimientos temblorosos de mandíbula (TJM)*

Los animales utilizados en este tipo de experimentos fueron colocados en un habitáculo transparente de dimensiones 12x10x8 cm que permitió la observación directa del animal. La administración intraperitoneal de pilocarpina para inducir este tipo de movimientos, definidos como descensos rápidos de la mandíbula inferior que se asemejan al masticado pero no están dirigidos por ningún estímulo (Trevitt et ál., 1998; Salamone et ál., 1998), se consideró el inicio del experimento. La administración intraperitoneal del antagonista SCH-58261 o de la tropicamida se produjo 15 minutos antes del inicio. El conteo de los TJM se realizó por un observador entrenado, ciego a las condiciones experimentales de cada animal. Este observador contó el número de TJM durante 2 minutos a intervalos de 5 minutos durante el tiempo total del experimento (60 minutos). La pilocarpina (Sigma) fue disuelta en solución salina al 0.9%, el antagonista SCH-58261 se diluyó en una mezcla etanol-solución salina en una proporción 10:90 y la tropicamida (Alcon) se administró diluida en solución salina.

#### 3.2. *Actividad locomotora en campo abierto*

Los animales utilizados en este experimento fueron aclimatados a condiciones de oscuridad en la sala correspondiente, en presencia de luz roja, durante al menos una hora previa al inicio de la actividad experimental. Los animales en estudio se situaron

en el centro del campo, una superficie blanca y lisa de 40 cm de diámetro, y utilizando una cámara situada en el eje vertical a este campo se grabaron sus movimientos durante 5 minutos. Utilizando el programa de análisis de vídeo LabVIEW (National Instruments) se determinó la distancia recorrida durante ese tiempo. La administración oral del antagonista preladenant (SCH-420814, Palo Biofarma), disuelto en una solución 0.5% de carboximetilcelulosa, se realizó 30 minutos antes del inicio del experimento.





## **RESULTADOS**



## 1. ESTUDIO DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G: EL RECEPTOR DE ADENOSINA A<sub>2A</sub> Y LA FORMACIÓN DE HOMÓMEROS Y HETERÓMEROS DE ORDEN SUPERIOR A DOS

La homodimerización del receptor de adenosina A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R) ha sido previamente caracterizada por medio de numerosas aproximaciones metodológicas, incluyendo las técnicas de BRET y FRET (Canals et ál., 2004). En cambio, hasta el momento no se ha podido corroborar la formación de oligómeros de este GPCR de más de dos miembros. En consecuencia, mediante la implementación de una nueva técnica experimental (BiFC), asociada a la técnica de BRET, se intentó demostrar la formación de oligómeros de A<sub>2A</sub>R de orden superior a dos.

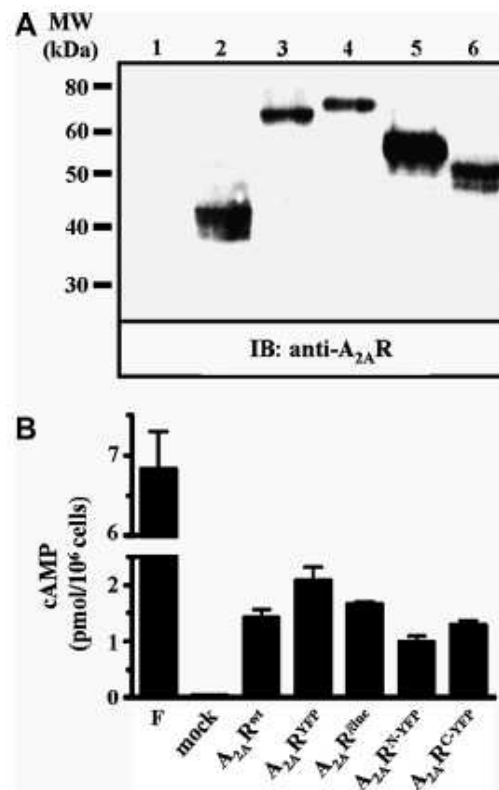
### 1.1. Homodímeros del receptor A<sub>2A</sub>R por BiFC

El ensayo de BiFC, es un método de complementación de fragmentos proteicos que se basa en la capacidad de producir un complejo fluorescente a partir de miembros no fluorescentes (Kerppola, 2006). Así, en el caso que se produzca una interacción proteína-proteína es posible detectarla mediante la emisión de fluorescencia. De forma interesante, mediante esta aproximación experimental se pueden analizar estas interacciones en un ambiente celular normal, permitiendo su visualización en células vivas. Para llevar a cabo el ensayo de BiFC y demostrar la formación de oligómeros de A<sub>2A</sub>R, se generaron dos constructos en los que se fusionó al receptor en su extremo C-terminal una de las dos mitades de la proteína fluorescente YFP (o bien el fragmento C-YFP o bien el N-YFP). Estas dos nuevas proteínas de fusión (A<sub>2A</sub>R<sup>N-YFP</sup> y A<sub>2A</sub>R<sup>C-YFP</sup>) fueron utilizadas junto a otras ya existentes en nuestro laboratorio, (A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>, A<sub>2A</sub>R<sup>RLuc</sup> y A<sub>2A</sub>R<sup>wt</sup>).

En primer lugar, se realizó la caracterización molecular de todas las construcciones que contenían el A<sub>2A</sub>R. Para tal fin, se transfectaron transitoriamente en células HEK, y una vez obtenidas las membranas celulares se analizó mediante Western blot la expresión de los distintos constructos. De forma interesante, el anticuerpo anti-A<sub>2A</sub>R de ratón detectó una banda de ~42 kDa en extractos de células HEK transfectadas transitoriamente con la forma humana de A<sub>2A</sub>R<sup>wt</sup> (Fig. 13A). Esta banda no apareció en los extractos de las células control. Por su parte, el mismo anticuerpo detectó una banda de ~69, ~78, ~60 y

## Resultados

~52 kDa en extractos de células HEK transfectadas con  $A_{2A}R^{YFP}$ ,  $A_{2A}R^{Rluc}$ ,  $A_{2A}R^{N-YFP}$  y  $A_{2A}R^{C-YFP}$ , respectivamente (Fig. 13A).

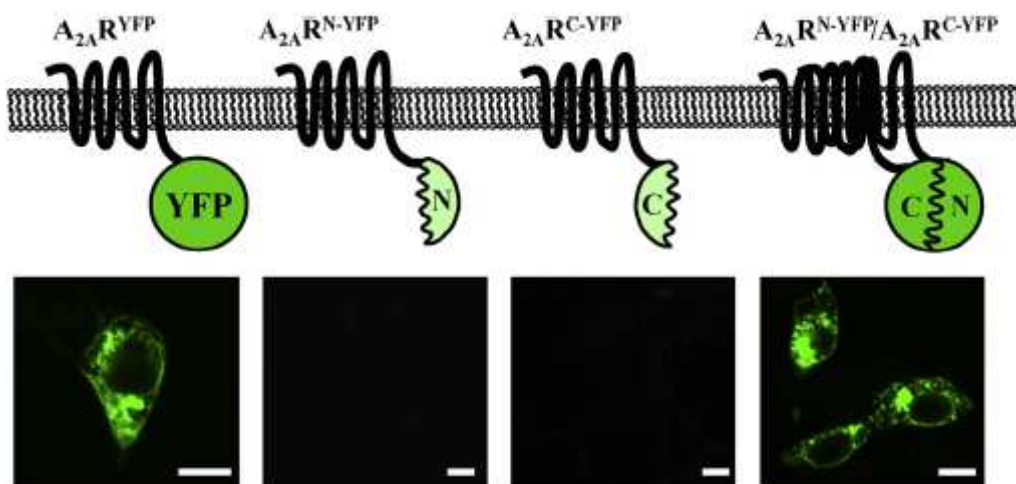


**Fig. 13.** A) Expresión de proteínas de fusión de  $A_{2A}R$ . Detección por inmunoblot usando un anticuerpo anti- $A_{2A}R$  de células transfectadas transitoriamente con un plásmido control (carril 1),  $A_{2A}R^{WT}$  (carril 2),  $A_{2A}R^{YFP}$  (carril 3),  $A_{2A}R^{Rluc}$  (carril 4),  $A_{2A}R^{N-YFP}$  (carril 5) o  $A_{2A}R^{C-YFP}$  (carril 6). B) Determinación de la acumulación de AMPc. Células HEK-293 con las mismas transfecciones transitorias se estimularon durante 10 min con CGS21680 200 nM (CGS) o forskolina 10  $\mu$ M (F) solo para las células mock y se determinó la acumulación específica de AMPc. Los resultados expresan la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes.

Seguidamente, se determinó la funcionalidad de estas construcciones de  $A_{2A}R$ . Para ello, se evaluó su capacidad de señalización mediante la medida de los niveles intracelulares de AMP cíclico. Así, en células HEK que expresaban transitoriamente las distintas construcciones de  $A_{2A}R$ , la incubación con el agonista de  $A_{2A}R$  CGS21680 indujo una acumulación de AMPc significativamente mayor respecto al control (células sin transfectar, mock) y comparativamente similar entre todas ellas (Fig. 13B). Por lo tanto, la incorporación en la cola C-terminal de  $A_{2A}R$  de las proteínas Rluc, YFP o fragmentos de la misma no afectó a su funcionalidad.

Una vez comprobada la expresión y funcionalidad de los distintos constructos, se analizó la capacidad de reconstitución de las dos mitades N-YFP y C-YFP, y por tanto

la formación del homodímero  $A_{2A}R$ , ya que solo bajo esta condición es posible la visualización de la proteína fluorescente YFP. De manera interesante, el constructo  $A_{2A}R^{YFP}$  se expresó en células transfectadas con el mismo y se pudo visualizar mediante microscopía confocal, mientras que las células que expresaban el receptor fusionado solo a una de las dos mitades YFP (i.e.  $A_{2A}R^{N-YFP}$  o  $A_{2A}R^{C-YFP}$ ) no mostraron esa fluorescencia, corroborando el hecho que los fragmentos por sí solos no son fluorescentes (Fig. 14). En cambio, cuando se cotransfectaron  $A_{2A}R^{N-YFP}$  y  $A_{2A}R^{C-YFP}$  se produjo la reconstitución de la proteína YFP, permitiendo la detección de fluorescencia, y pudiendo por lo tanto visualizar el homodímero del receptor  $A_{2A}$  en células vivas (Fig. 14).



**Fig. 14.** Visualización de los homodímeros de  $A_{2A}R$  por ensayos de BiFC. Células transfectadas transitoriamente con  $A_{2A}R^{YFP}$ ,  $A_{2A}R^{N-YFP}$ ,  $A_{2A}R^{C-YFP}$ , o  $A_{2A}R^{N-YFP}$  y  $A_{2A}R^{C-YFP}$  se procesaron para obtener imágenes por microscopía confocal. Para ello se utilizó el láser de análisis confocal Olympus Fluoview 500 adaptado a un microscopio invertido Olympus IX-70. En la parte superior, una representación esquemática muestra las especies del receptor expresadas en la membrana plasmática. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Cabe comentar en este punto que existe la posibilidad de que los fragmentos N-YFP y C-YFP complementen con baja eficiencia en ausencia de cualquier interacción específica y formar un complejo fluorescente, un fenómeno que ya ha sido descrito (Kerppola, 2006). Por ello, para asegurar que la homodimerización descrita no se debía a esta reconstitución espontánea de la proteína YFP se realizaron una serie de controles negativos. El más apropiado para este tipo de técnica es el uso de una proteína de fusión que se exprese en los mismos compartimentos subcelulares y con un comportamiento similar al de la proteína en estudio, pero que no exista interacción entre ambas. En este

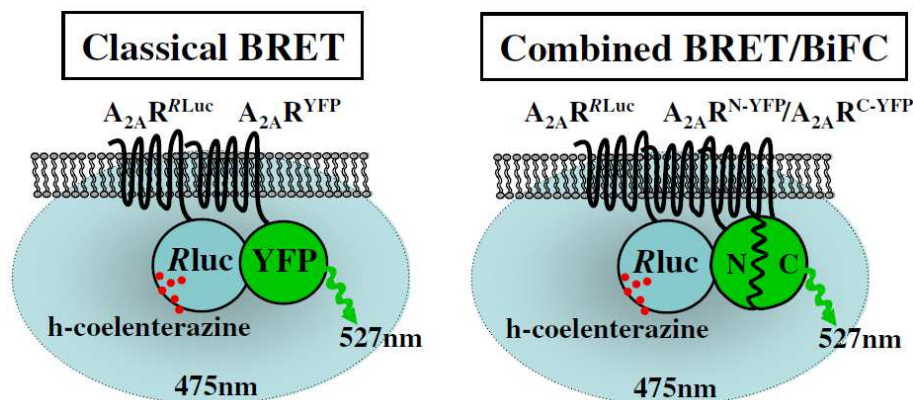
## Resultados

estudio se utilizó otro receptor acoplado a proteína G, en concreto el receptor humano  $GABA_{B1b}$ . Así, bajo las mismas condiciones experimentales, no fuimos capaces de detectar fluorescencia derivada de la complementación molecular entre dicho receptor y  $A_{2A}R$  (datos no mostrados).

En conjunto, pues, estos resultados corroboraron que la homodimerización de los receptores  $A_{2A}$  de adenosina en células vivas es un fenómeno específico que puede ser detectado mediante BiFC.

### 1.2. Oligómeros de $A_{2A}R$ de orden superior a dos: Homo-oligómeros

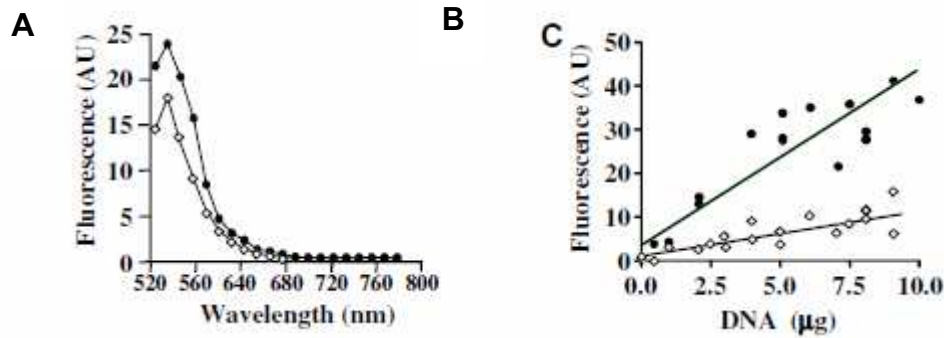
Una vez corroborada la existencia de homodímeros de  $A_{2A}R$ , procedimos a probar la existencia de oligómeros de  $A_{2A}R$  de orden superior a dos. Para ello, como se ha comentado con anterioridad, diseñamos una nueva aproximación experimental consistente en la combinación de las técnicas de BRET y BiFC (Fig. 15).



**Fig. 15.** Representación esquemática comparando el BRET clásico y la combinación BRET/BiFC. La señal BRET se inicia con la oxidación de la coelenterazina-h por la  $R_{luc}$  fusionada al extremo C-terminal de la construcción  $A_{2A}R^{R_{luc}}$ . Esta reacción enzimática produce una emisión de luz a la longitud de onda indicada (475 nm), la cual es capaz de excitar al fluoróforo aceptor adecuado cuando se encuentra a una corta distancia (10 nm). Este aceptor puede ser una  $YFP$  fusionada a  $A_{2A}R$  ( $A_{2A}R^{YFP}$ ) o incluso una  $YFP$  complementada mediante homodímeros  $A_{2A}R$  ( $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ), resultando en una emisión a 527 nm.

Inicialmente, caracterizamos las condiciones experimentales de esta nueva metodología. Así, en primer lugar se probaron distintas proporciones de transfección de los constructos conteniendo las dos mitades N-YFP y C-YFP, y se llegó a la conclusión que la proporción óptima de transfección  $A_{2A}R^{N-YFP}$  y  $A_{2A}R^{C-YFP}$  era 1:1. Por otra parte, es importante comentar que las características espectrales de la proteína  $YFP$  reconstituida no estaban alteradas respecto a la  $YFP$  completa (Fig. 16A) Además, se determinó la eficiencia en la emisión fluorescente de  $YFP$  complementada por el homodímero de

$A_{2A}R$  (i.e.  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ), constatando que esta era menor que la obtenida por  $A_{2A}R^{YFP}$ , como era esperable (Fig. 16B). Entre los aspectos que determinan este fenómeno, hay que tener en cuenta la presencia de otros dímeros no fluorescentes (i.e.  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{N-YFP}$  y  $A_{2A}R^{C-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ) como una de las causas principales de la reducción en la eficiencia de fluorescencia en el BiFC.



**Fig. 16.** A) Perfil de la emisión espectral de  $A_{2A}R^{YFP}$  (●) y de la YFP complementada por homodímeros de  $A_{2A}R$  (◇). B) Eficiencia en la complementación de YFP mediada por homodimerización. Se transfectoron cantidades crecientes de  $A_{2A}R^{YFP}$  (●) o su equivalente con  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  en una proporción 1:1 (◇). La fluorescencia de cada muestra se midió y expresó en unidades arbitrarias.

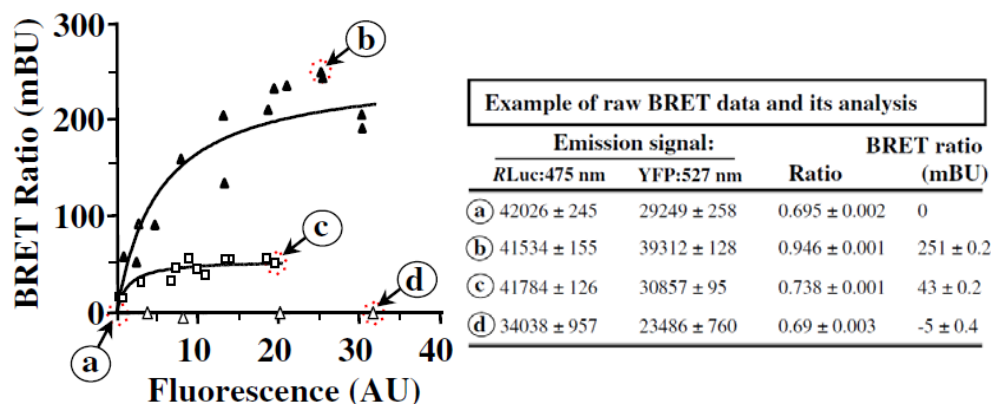
En cualquier caso, la cotransfección de los constructos  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  permitió la emisión de fluorescencia de la proteína YFP, por lo que el siguiente paso consistió en comprobar si se podía producir el fenómeno de BRET con un constructo que contuviera la proteína RLuc ( $A_{2A}R^{RLuc}$ ). De esta forma, realizamos curvas de saturación de BRET en células cotransfectadas con una cantidad constante de  $A_{2A}R^{RLuc}$  y concentraciones crecientes de  $A_{2A}R^{YFP}$  o  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$ . Como era esperable, obtuvimos una señal positiva de BRET para la transmisión de energía entre  $A_{2A}R^{RLuc}$  y  $A_{2A}R^{YFP}$  (Fig. 17). La señal BRET aumentó de manera hiperbólica en función de la concentración de la construcción fusionada a YFP (determinada como la fluorescencia emitida por excitación directa a 480 nm) hasta formar una asíntota. Dado que el par  $A_{2A}R^{RLuc}/GABA_{B2}R^{YFP}$  no produjo una señal detectable de BRET (Fig. 17), la señal hiperbólica encontrada para la pareja  $A_{2A}R^{RLuc}/A_{2A}R^{YFP}$  indica que la interacción entre las dos moléculas de este receptor de adenosina es específica, de acuerdo con resultados anteriormente publicados (Canals et ál., 2004).

Finalmente, de forma destacada, se obtuvo una señal positiva de BRET en forma de función hiperbólica en el caso en el que la molécula aceptora estaba formada por el homodímero que expresaba una YFP complementada (cotransfección de  $A_{2A}R^{RLuc}$



## Resultados

$/A_{2A}R^{N-YFP} / A_{2A}R^{C-YFP}$ ), sugiriendo así la existencia de oligómeros compuestos por más de dos miembros (Fig. 17).



**Fig. 17.** Curvas de saturación de BRET. Se midió el BRET en células transfectadas con  $A_{2A}R^{RLuc}$  junto a  $A_{2A}R^{YFP}$  ( $\blacktriangle$ ), a  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  ( $\square$ ), o a  $GABA_{B2}R^{YFP}$  ( $\triangle$ ). Las cotransfecciones se realizaron con cantidades crecientes de las construcciones para YFP, mientras que la construcción con  $RLuc$  se mantenía constante. El panel de la derecha muestra la monitorización de estos valores, confirmando su variación (YFP) o estabilidad ( $RLuc$ ), en diferentes puntos. En el gráfico de la izquierda, los ratios de BRET obtenidos tras la adición de coelenterazina-h se representaron en función del valor de YFP normalizado.

Hay que aclarar en este punto que el incremento en la ratio de BRET observado tanto en el par  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{YFP}$  como en el conjunto  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{N-YFP} / A_{2A}R^{C-YFP}$  se debió a un aumento en la señal de emisión a 527 nm (YFP) tras la adición de coelenterazina-h, y no por una reducción de la emisión a 475 nm ( $RLuc$ ) por fenómenos de inhibición (*quenching*) o de sobreexpresión, confirmando la especificidad de la señal de BRET observada (Fig. 17).

El análisis de los resultados mostrados en la figura 5 reveló diferencias notables entre las curvas obtenidas. Así, el máximo de energía transferida ( $BRET_{max}$ ) observado en el conjunto  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{N-YFP} / A_{2A}R^{C-YFP}$  fue 4.5 veces menor que para la pareja  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{YFP}$  ( $55 \pm 6$  y  $250 \pm 15$ , respectivamente). Por otra parte, la concentración de aceptor que proporcionó un 50% de ese valor máximo ( $BRET_{50}$ ), que se considera un parámetro que permite comparar la intensidad de la interacción, fue también más bajo para  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{N-YFP} / A_{2A}R^{C-YFP}$  en comparación con  $A_{2A}R^{RLuc} / A_{2A}R^{YFP}$  ( $1.1 \pm 0.3$  y  $5.2 \pm 1.2$ , respectivamente). De esta forma, el ensayo de BiFC/BRET permitió detectar la formación de oligómeros de orden mayor a dos, pero existen muchos factores que discutir (v.g. cantidad de aceptor presente, la composición de los oligómeros detectados y otros factores físicos propios de este tipo de

transferencia de energía) para poder concluir cuestiones como por ejemplo la proporción de los diferentes complejos en la membrana plasmática.

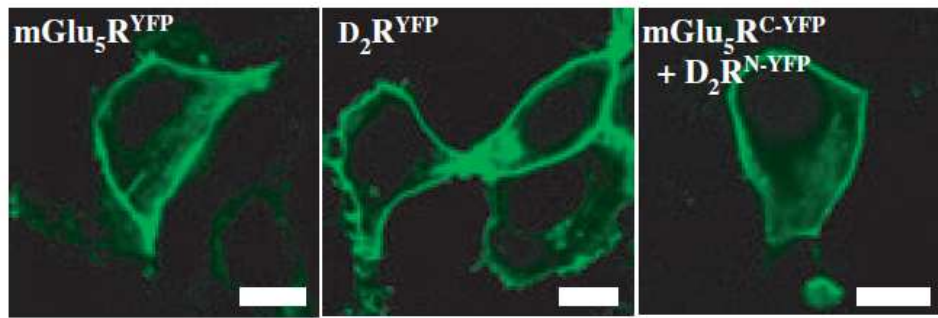
En resumen, al combinar las técnicas de BRET y BiFC, pudimos detectar en células vivas por primera vez oligómeros del receptor de adenosina  $A_{2A}$  compuestos por más de dos miembros, proporcionando nuevas perspectivas en cuanto a la composición de oligómeros de receptores acoplados a proteína G.

El conjunto de estos resultados se presentó como artículo, titulado “Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET–BiFC technique” y fue publicado en la revista “FEBS Letters” (Anexo I).

### *1.3. Oligómeros de $A_{2A}R$ de orden superior a dos: Hetero-oligómeros*

La oligomerización del receptor de adenosina  $A_{2A}$  formando complejos diméricos, ya con sí mismo u otros receptores, es un hecho que ha sido ya demostrado ampliamente (Ferré et ál., 2002, Canals et ál. 2003). Sin embargo, no sucede lo mismo respecto a la formación de complejos de orden superior a dos. De esta forma, a pesar de conocerse la interacción directa entre el receptor  $A_{2A}$  de adenosina tanto con el receptor  $D_2$  de dopamina ( $D_2R$ ) como con el receptor metabotrópico 5 de glutamato ( $mGlu_5R$ ) por separado, hasta el momento de iniciar este trabajo tan solo existían indicios bioquímicos y de comportamiento animal de una posible interacción oligomérica entre estos tres GPCR. Es por ello que, una vez implementada la aproximación combinando las técnicas de BRET y BiFC para describir interacciones en un oligómero de tres miembros, quisimos utilizar esta nueva herramienta para probar de manera directa la posible existencia del oligómero  $A_{2A}R/D_2R/mGlu_5R$ .

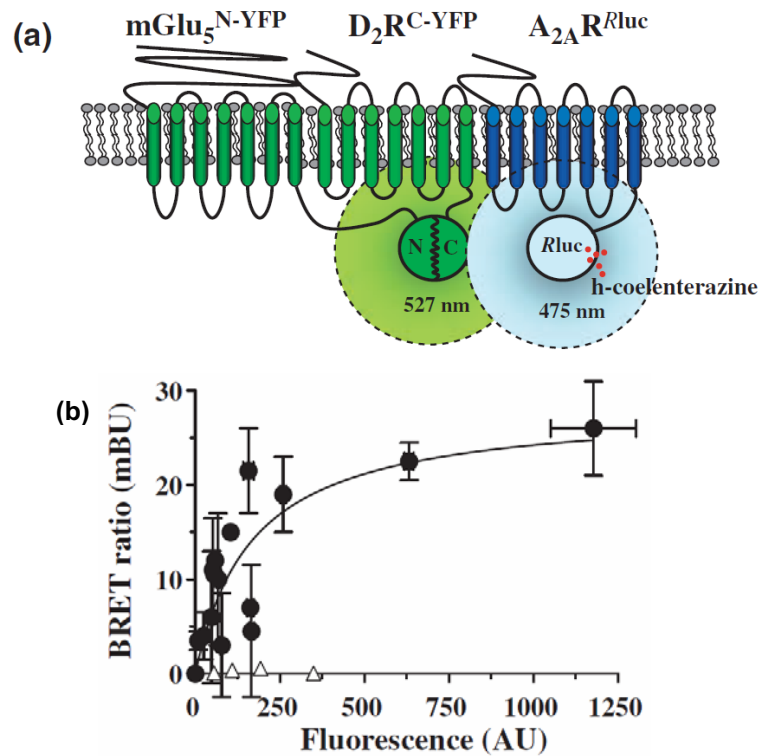
Para ello, en primer lugar clonamos las siguientes proteínas de fusión:  $D_2R^{N-YFP}$ ,  $D_2R^{C-YFP}$ ,  $mGlu_5R^{N-YFP}$  y  $mGlu_5R^{C-YFP}$  de manera similar a como se hizo para el receptor  $A_{2A}R$ . A continuación, de las seis construcciones con las que poder realizar BiFC, se determinó qué pareja presentaba una mejor eficiencia de emisión de fluorescencia. Así, se pudo observar que la cotransfección de  $mGlu_5R^{N-YFP}$  y  $D_2R^{C-YFP}$  era la que resultaba en una mejor complementación y mayores niveles de fluorescencia (datos no mostrados). Por otra parte, la distribución del heterodímero  $D_2R/mGlu_5R$  detectada con esta técnica mostró por microscopía confocal una distribución subcelular muy parecida a las de ambos receptores por separado (Fig. 18).



**Fig. 18.** Visualización del heterómero D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R. Se transfectaron transitoriamente células HEK con los ADNc indicados (D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup>, mGlu<sub>5</sub>R<sup>YFP</sup> y mGlu<sub>5</sub>R<sup>N-YFP</sup>+D<sub>2</sub>R<sup>C-YFP</sup>) y se procesaron para obtener imágenes por microscopía confocal. Las observaciones se realizaron con un láser de análisis confocal Olympus Fluoview 500 adaptado a un microscopio invertido Olympus IX-70. Barra de escala: 10µm.

De forma similar a los experimentos realizados con el homodímero A<sub>2A</sub>R, para descartar que la reconstitución de YFP no se debiera a interacciones aleatorias entre las dos mitades de la proteína fluorescente, se realizaron experimentos de BiFC de nuestras construcciones con otros GPCR control. Usando tanto GABA<sub>B1b</sub>R como GABA<sub>B2</sub>R en las mismas condiciones experimentales, no detectamos fluorescencia por complementación con D<sub>2</sub>R o mGlu<sub>5</sub>R (imágenes no mostradas). Así pues, pudimos concluir que fuimos capaces de visualizar por primera vez la heterodimerización de estos dos receptores, fenómeno que es específico y que sucede a nivel de la membrana plasmática.

Seguidamente, y manteniendo las condiciones experimentales descritas anteriormente, pasamos a realizar experimentos de BRET utilizando como molécula donadora la construcción A<sub>2A</sub>R<sup>RLuc</sup> en una cantidad constante y cantidades crecientes de los plásmidos que codificaban para mGlu<sub>5</sub>R<sup>C-YFP</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>N-YFP</sup> o, alternativamente, de la construcción GABA<sub>B2</sub>R<sup>YFP</sup> como control negativo.



**Fig. 19.** Detección de complejos heteroméricos de A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R por ensayos combinados de BRET y BiFC. A) Representación esquemática del ensayo. La molécula donadora de energía A<sub>2A</sub>R<sup>RLuc</sup> oxida el sustrato coelenterazina-h, cuya emisión a 475 nm tiene la capacidad de excitar a la molécula aceptora, compuesta por el heterodímero D<sub>2</sub>R<sup>C-YFP</sup>/mGlu<sub>5</sub>R<sup>N-YFP</sup>, produciéndose una emisión a 527 nm. B) Curva de saturación de BRET. Se midió el ratio de BRET en células cotransfectadas con A<sub>2A</sub>R<sup>RLuc</sup> junto a mGlu<sub>5</sub>R<sup>N-YFP</sup>+D<sub>2</sub>R<sup>C-YFP</sup> (●) o a GABA<sub>B2</sub>R<sup>YFP</sup> (Δ), manteniendo la primera construcción en una cantidad constante y aumentando gradualmente los constructos para YFP. Estos ratios se representaron en función de la cantidad total de YFP normalizada.

Así, se obtuvo una señal positiva de BRET para la transferencia de energía entre A<sub>2A</sub>R<sup>RLuc</sup> y mGlu<sub>5</sub>R<sup>C-YFP</sup>/D<sub>2</sub>R<sup>N-YFP</sup> (Fig. 19). La especificidad de esta señal, que incrementó en forma hiperbólica en función de la cantidad de YFP complementada por el heterodímero (determinada por excitación directa a 480 nm), indicó, por lo tanto, la existencia de oligómeros de GPCR formados por más de dos protómeros, i.e. heterómeros mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R.

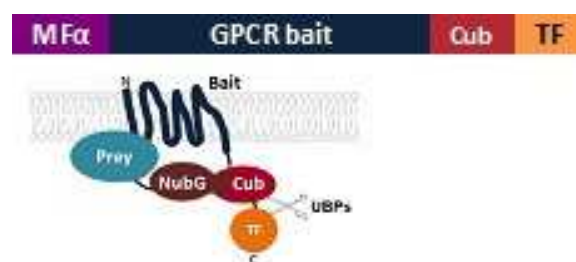
Estos resultados, en conjunto con otras técnicas bioquímicas basadas en la transferencia de energía (v.g. SRET, desplazamiento de BRET) y otras aproximaciones metodológicas (v.g. coimmunoprecipitaciones, microscopía electrónica) fueron publicados en la revista *Journal of Neurochemistry* bajo el título “Metabotropic glutamate type 5, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors form higher-order oligomers in living cells” (ver Anexo II) describiendo la formación de este oligómero y

## Resultados

demuestran, como en el caso del homómero  $A_{2A}R$ , que los GPCR pueden organizarse en estructuras complejas.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS INTERACCIONANTES CON A<sub>2A</sub>R

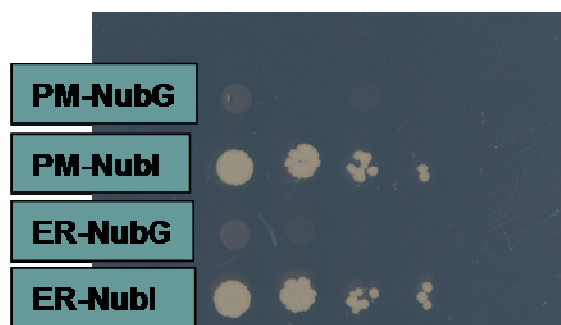
En el apartado anterior hemos descrito los experimentos realizados para determinar que A<sub>2A</sub>R es capaz de formar complejos oligoméricos de GPCR de más de dos miembros, tanto homo-oligómeros como hetero-oligómeros. Una vez llegados a este punto, consideramos que encontrar otros participantes de este entramado de interacciones proporcionaría una mejor comprensión de cómo se produce la transducción de señales en sistemas tan complejos y, a la vez, añadiría nuevas estrategias terapéuticas en patologías en las que alteraciones en estos receptores fueran relevantes. Con esta finalidad, iniciamos una colaboración con grupos de investigación de diversos países y bajo la coordinación del Dr. Igor Stagljar, del Departamento de Bioquímica y Genética Molecular de la Universidad de Toronto, nos involucramos en un proyecto para generar un nuevo “interactoma” de 50 GPCR (46 de clase A o *rhodopsin-like*, 2 de clase B o *secretin-like* y 2 de clase F). De esta forma, utilizamos el ensayo de doble híbrido de membrana en levadura con ubiquitina partida modificada (*modified split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid*, MYTH) con las secuencias completas de esos receptores humanos, en nuestro caso A<sub>2A</sub>R, para identificar las posibles proteínas que interaccionan con este receptor cuando se expresa en la membrana plasmática. El protocolo de esta metodología fue diseñado y publicado recientemente por el mismo laboratorio coordinador (Snider et ál., 2010; ver Metodología).



**Fig. 20.** Representación de la construcción GPCR-anzuelo, conteniendo el factor de maduración  $\alpha$  (MF $\alpha$ ), la secuencia del receptor, la mitad C-terminal de la ubiquitina (Cub) y el factor de transcripción (TF). En la parte inferior, esquema del funcionamiento del sistema de doble híbrido de membrana (MYTH) con ubiquitina partida modificada. La proteína presa (*prey*) interacciona con el GPCR-anzuelo (*bait*) y fuerza la reconstitución de NubG y Cub. Una vez formada la ubiquitina, se pueden reclutar las proteasas específicas de ubiquitina (UBPs) y por su acción liberarse el factor de transcripción que activará los genes de selección.

### 2.1. Generación de los GPCR-anzuelo humanos y su validación

El primer paso fue generar las proteínas anzuelo (*bait*), consistentes en los receptores mencionados fusionados por su extremo N-terminal al factor de apareamiento  $\alpha$  de levadura (para inducir la localización en membrana plasmática), y unidos en la cola C-terminal a una mitad de la proteína ubiquitina (Cub) y a un factor de transcripción artificial compuesto por LexA y VP16 (Fig. 20). Tras comprobar con los controles correspondientes que estos GPCR-anzuelo tenían la correcta localización subcelular y no provocaban una autoactivación del sistema (Fig. 9), los pasamos a aplicar en el cribado por MYTH de alto rendimiento para identificar nuevos elementos asociados a esos receptores.



**Fig. 21.** Controles de autoactivación y localización de la expresión de la proteína-anzuelo en experimentos de MYTH. Una cepa de levadura que expresaba la proteína de fusión A<sub>2A</sub>R-Cub-TF fue cotransformada y sembrada en diluciones seriadas en medio de selección con proteínas no interaccionantes con nuestro anzuelo, residentes en membrana plasmática (PM) o retículo endoplasmático (ER). Estas proteínas estaban fusionadas a Nubl (la mitad de ubiquitina complementaria en forma nativa, que permite una reconstitución espontánea) o NubG (la misma mitad pero mutada) para evaluar, respectivamente, la activación del sistema de cribado en ambas localizaciones celulares y que esta activación es dependiente de la interacción específica entre anzuelo y presa.













### 2.2. Cribado por MYTH de los GPCR, especificidad de la interacción y depuración del interactoma

Los cribados por MYTH se realizaron por duplicado utilizando cepas de levadura que expresaban el GPCR-anzuelo validado (A<sub>2A</sub>R-Cub-TF) contra una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano, integrada en un vector-presa que fusionaba a esas secuencias la otra mitad de la ubiquitina (NubG). Es interesante mencionar que, dado que la estrategia de construcción de la biblioteca de ADNc fue por restricción enzimática, se evaluaron tanto secuencias truncadas como otras completas. Como resultado, algunos

de los miembros de esa biblioteca contenían también GPCR truncados que retenían la capacidad para heterodimerizar con el GPCR-anzuelo, aumentándose la posibilidad de identificar nuevas interacciones GPCR-GPCR.

El protocolo seguido, brevemente, consistió en transformar estas librerías en las cepas de levadura que expresaban los GPCR-anzuelo y crecer las colonias aisladas sobre medio selectivo sólido. Estas colonias fueron pasadas a continuación a medio líquido para la obtención de su ADN, el cual se amplificó en *E. coli* y se extrajo para su secuenciación con un *primer* común a toda la biblioteca. Las secuencias obtenidas generaron una lista de candidatos, que se refinó descartando aquellas correspondientes a regiones no codificantes (v.g. intrones), elementos biológicamente no significativos (i.e. péptidos señal para el procesamiento de proteínas, contaminantes ribosomales) y falsos positivos (v.g. proteínas de membrana mitocondrial biológicamente inaccesibles, proteínas detectadas en numerosos cribados de GPCR de diferentes familias, etc.).

A continuación, las secuencias restantes fueron probadas con una proteína-anzuelo no relacionada al GPCR-anzuelo original para descartar resultados no específicos para este último (Fig. 22).

Control bait	A <sub>2A</sub> R bait	Test result
		✓
		✓
		✗
		✗
		✗
		✓

**Fig. 22.** Test de dependencia de anzuelo (*bait dependency test*). Las secuencias-presa obtenidas en los cribados por MYTH fueron purificadas y transformadas de nuevo en levaduras que contenían nuestro anzuelo (A<sub>2A</sub>R) o una proteína control no relacionada. Diferentes colonias de estas levaduras se sembraron en medio de selección y se determinó la especificidad de la interacción con la presa en el caso en que hubiera una mayoría de colonias positivas (crecidas y azules) para A<sub>2A</sub>R, pero no en la cepa de levadura con anzuelo control.



## Resultados

En el caso de nuestro constructo A<sub>2A</sub>R-Cub-TF, se seleccionaron por el cribado un total de 103 secuencias, de las cuales 47 (representando una media de 638 pares de bases) pasaron al test de dependencia de anzuelo, identificándose finalmente las siguientes proteínas:

Tabla 2. Lista de proteínas interaccionantes con A<sub>2A</sub>R encontradas en el cribado por MYTH de una librería de ADNc de cerebro fetal humano.

Nombre	Localización	Función
Calcium-activated potassium channel subunit beta-1	Membrana	Reguladora
Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae) (YIF1B)	Membrana	-
Solute carrier family 35, member B1 (SLC35B1)	Membrana (RE)	Transportador
Transmembrane protein 203 (TMEM203)	Membrana	-
Proteolipid protein 1 (PLP1), transcript variant 1	Membrana	Mielinización
Rhomboid domain containing 2 (RHBDD2)	Membrana (Golgi)	-
Niemann-Pick disease protein, type C1 (NPC1)	Endosoma	Transportador
Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit (AP2M1)	Citoplasma	Internalización
Melanoma antigen family H, 1 (MAGEH1)	Citoplasma	-
G protein-coupled receptor 37 (endothelin receptor type B-like) (GPR37)	Membrana	-

Una vez obtenidos estos datos, su análisis preliminar nos reveló proteínas con diversas funciones (transportadoras, reguladoras, etc.), así como otras con esta característica por determinar. Por otra parte, cabe destacar que se identificaron tanto elementos citoplasmáticos como integrales de membrana y, muy notablemente, surgió otro miembro de la familia de los GPCR, GPR37. Respecto a este receptor, como se comenta más adelante, se ha postulado su posible implicación en la enfermedad de Parkinson, en la que el A<sub>2A</sub>R también juega un papel fundamental, por lo que decidimos priorizar la validación de la interacción entre A<sub>2A</sub>R y GPR37.

Por último, cabe comentar que en el conjunto del proyecto con los 50 GPCR estudiados, se encontraron interacciones entre 699 proteínas, incluyendo 368 proteínas de membrana (un 37% del total). Todos estos resultados se encuentran en proceso de publicación, en la que se describen validaciones físicas y funcionales de nuevas interacciones de proteínas encontradas con su correspondiente GPCR. Asimismo, se hace un análisis global de las redes encontradas y se destacan aquellas que influyen más directamente en ciertas patologías, como el cáncer o algunas de las relacionadas con el sistema nervioso.

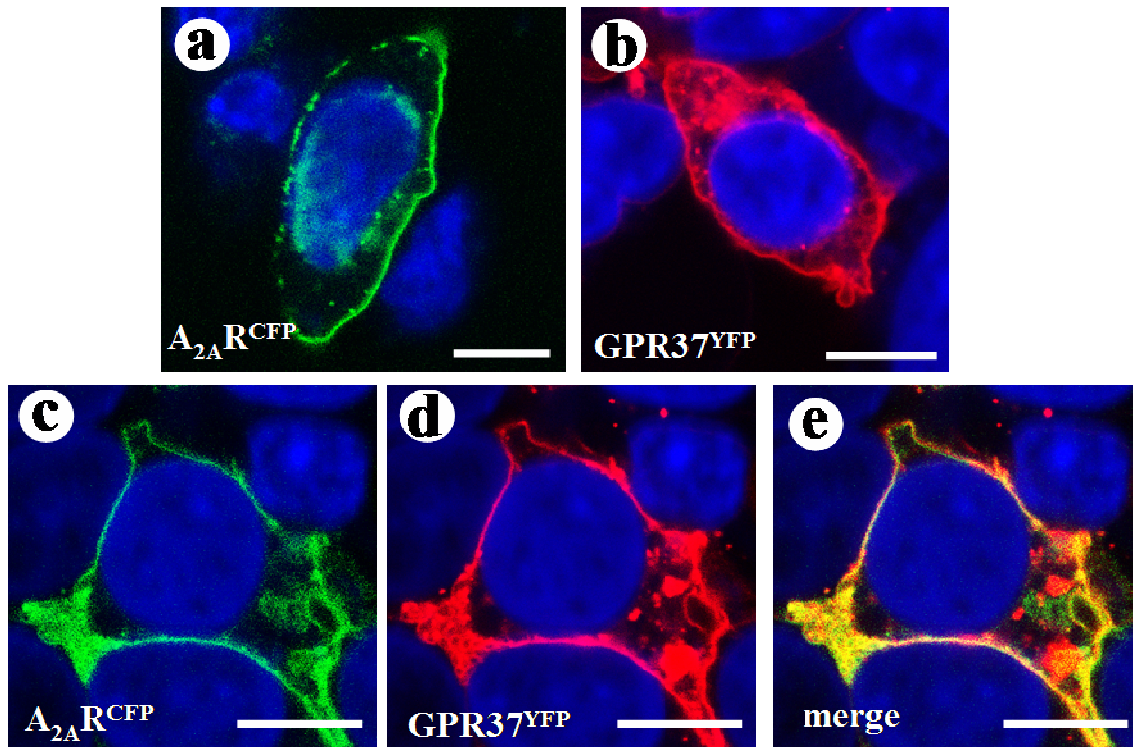
### 3. VALIDACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL RECEPTOR A<sub>2A</sub> DE ADENOSINA Y EL RECEPTOR HUÉRFANO GPR37

Entre las proteínas identificadas en los experimentos de doble híbrido de membrana para A<sub>2A</sub>R, quisimos estudiar con más detalle la interacción con el receptor huérfano GPR37. El interés por esta proteína en concreto derivó tanto de su pertenencia también a la familia de los GPCR, como por su implicación en la Enfermedad de Parkinson.

GPR37 es conocido también como Pael-R (Parkin-associated endothelin-like receptor, receptor parecido al de endotelina y asociado a parkin) y se expresa preferentemente en SNC, donde está especialmente enriquecido en cerebelo, cuerpo caloso, médula, putamen, núcleo caudado, sustancia negra e hipocampo (Donohue et ál., 1998; Marazziti et ál., 1997; Takahashi e Imai, 2003; Zeng et ál., 1997). Como su nombre indica, es sustrato de parkin, una ligasa E3 del tipo proteína-ubiquitina que participa como parte del proteasoma en la ubiquitinación y degradación de agregados proteicos (Dev et ál., 2003). La pérdida de función de parkin en la Enfermedad de Parkinson de inicio en el adulto joven (o de inicio precoz, YOPD), cuyo origen es autosómico recesivo, evita la degradación de sus sustratos (v.g. GPR37), lo que resulta en su acumulación tóxica (Shimura et ál., 2000; Sriram et ál., 2005; Zhang et ál., 2000). Además, se ha descrito la presencia de GPR37 en el núcleo de cuerpos de Lewy de pacientes de párkinson (Murakami et ál., 2004).

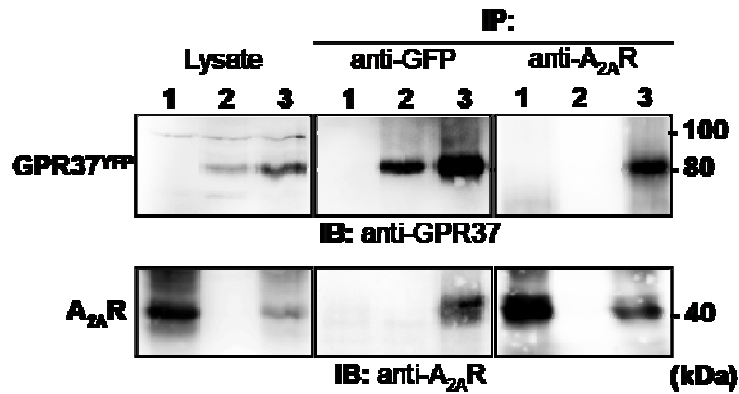
#### 3.1. Interacción física: células en cultivo

Inicialmente, la validación de la interacción entre A<sub>2A</sub>R y GPR37 se realizó en cultivos de células HEK293, donde se transfectaron transitoriamente las construcciones A<sub>2A</sub>R<sup>CFP</sup> y GPR37<sup>YFP</sup>. Estas células fueron procesadas para su análisis por microscopía confocal. Las imágenes obtenidas mostraron que ambas construcciones estaban presentes en la membrana plasmática y que, en el caso de las muestras cotransfectadas, existió un alto grado de codistribución entre ambas señales fluorescentes (Fig. 23).



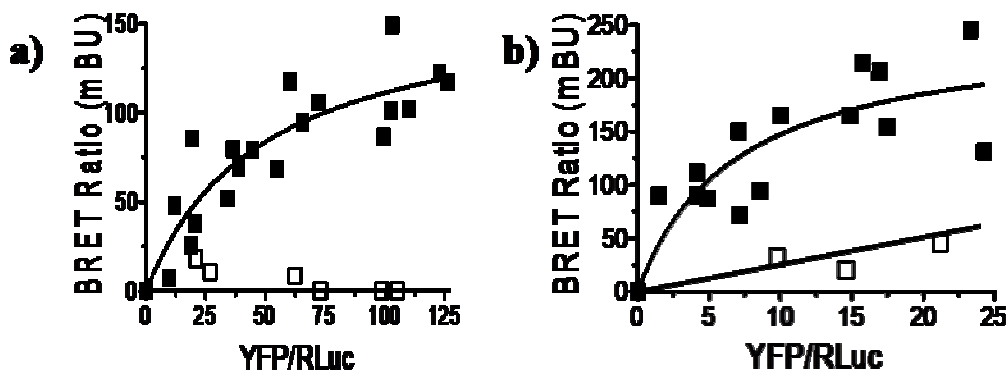
**Fig. 23.** Colocalización de  $A_{2A}R$  y GPR37 en células HEK. Se transfectaron células con  $A_{2A}R^{CFP}$  (a),  $GPR37^{YFP}$  (b) y  $A_{2A}R^{CFP}$  más  $GPR37^{YFP}$  (c-e), y se prepararon para obtener imágenes por microscopía confocal. Las muestras se excitaron a 430 nm (a, c, e) o 510 nm (b, d, e) y se filtraron sus emisiones para detectar CFP o YFP, respectivamente. En amarillo se destaca el solapamiento en las dos emisiones. Los núcleos celulares (azul) fueron teñidos con DAPI. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

Para confirmar que esta colocalización de los receptores se debía a una interacción física, se procedió a realizar experimentos de coimmunoprecipitación (Fig. 24). Así, membranas de células transfectadas con  $A_{2A}R$  (carril 1),  $GPR37^{YFP}$  (carril 2), o  $A_{2A}R$  y  $GPR37^{YFP}$  (carril 3) fueron procesadas para inmunoprecipitación, utilizándose anticuerpos de ambos receptores (Fig. 24). Los inmunoprecipitados, junto con muestras totales de los lisados celulares, fueron analizados por SDS-PAGE e inmunoblot. Así, se pudo comprobar que los inmunoprecipitados obtenidos usando un anticuerpo anti- $A_{2A}R$  en muestras que expresaban los dos receptores contenían también  $GPR37$ ; recíprocamente, al aislar de las muestras al receptor huérfano con su anticuerpo, pudimos detectar también la presencia de  $A_{2A}R$  solo en el caso de las células cotransfectadas (Fig. 24).



**Fig. 24.** Coimmunoprecipitación de  $A_{2A}R$  y GPR37 en células HEK. Se transfirieron células con  $A_{2A}R^{WT}$  (carril 1), GPR37<sup>YFP</sup> (carril 2) y  $A_{2A}R^{WT}$  más GPR37<sup>YFP</sup> (carril 3), y se obtuvieron lisados de estas muestras. Estos extractos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFP o bien con un anticuerpo monoclonal anti- $A_{2A}R$ . Los extractos crudos (Lysate) y los inmunoprecipitados (IP) se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot (IB) usando anticuerpos policlonales contra  $A_{2A}R$  o GPR37.

Los experimentos anteriores sugieren claramente la presencia de una interacción directa proteína-proteína entre  $A_{2A}R$  y GPR37. A continuación, pues, se empleó una técnica biofísica (i.e. BRET) para demostrar que las potenciales proteínas interaccionantes estaban ciertamente suficientemente próximas para dicha interacción directa una vez expresadas en las células en cultivo. Utilizando las dos combinaciones posibles de donador/aceptor ( $A_{2A}R^{RLuc}/GPR37^{YFP}$  y  $GPR37^{RLuc}/A_{2A}R^{YFP}$ ), se determinó la transferencia de energía en muestras con una concentración constante de la construcción con la proteína donadora (v.g.  $A_{2A}R^{RLuc}$  o  $GPR37^{RLuc}$ ) y cantidades crecientes de la molécula aceptora (v.g. GPR37<sup>YFP</sup> o  $A_{2A}R^{YFP}$ , respectivamente).



**Fig. 25.** Ensayos de BRET entre  $A_{2A}R$  y GPR37. Se obtuvieron curvas de saturación del ratio de BRET de células transfectadas con: a) GPR37<sup>RLuc</sup> con  $A_{2A}R^{YFP}$  (■) o  $A_{1R}^{YFP}$  (□), y b)  $A_{2A}R^{RLuc}$  con GPR37<sup>YFP</sup> (■) o CD4<sup>YFP</sup> (□). En ambos gráficos se mantuvo constante la cantidad de proteína de fusión donadora, mientras se transfirieron concentraciones crecientes del receptor fusionado a YFP. Los ratios de BRET obtenidos en tres experimentos independientes se representaron en función del valor de YFP normalizado.

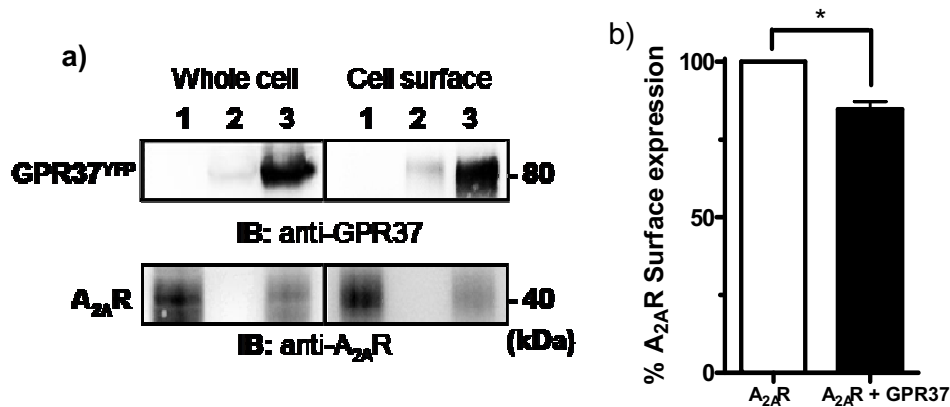
## Resultados

En estas condiciones, se pudieron obtener curvas saturables en ambos casos (Fig. 25), demostrando de esta manera la especificidad de la transferencia de energía. De manera interesante, en el caso de otras proteínas de membrana usadas como control (CD4 para  $A_{2A}R$  y  $A_{1R}$  para GPR37), la señal de BRET fue menor y no saturable.

### 3.2. Interacción funcional: células en cultivo

Una vez validada la interacción física entre  $A_{2A}R$  y GPR37, se planteó estudiar las consecuencias funcionales que se derivan de esta oligomerización.

En primer lugar, quisimos evaluar si la interacción  $A_{2A}R$ -GPR37 afectaba a la expresión en la membrana plasmática de ambos receptores. Así, mediante la técnica de biotinilación (i.e. marcar con biotina las proteínas de membrana para aislarlas y detectarlas), se pudo comprobar que GPR37 vio aumentada su presencia en membrana plasmática al ser coexpresado con  $A_{2A}R$ , mientras que la expresión en la superficie celular de este último se vio reducida de manera significativa (Fig. 26).

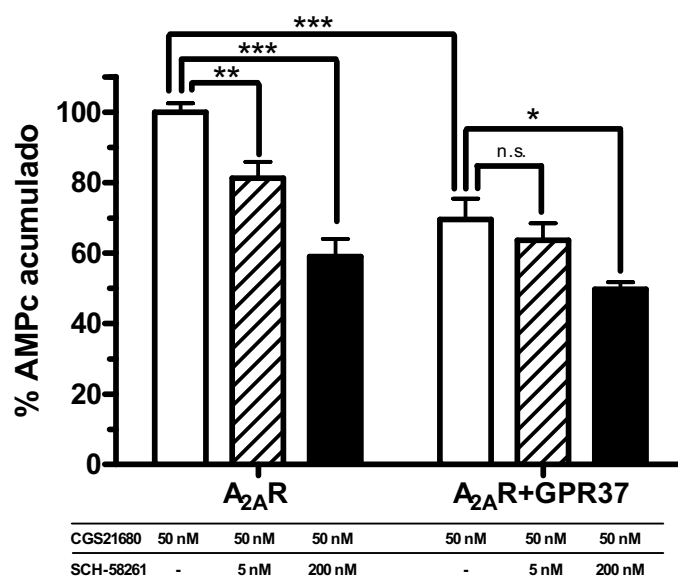


**Fig. 26.** Detección de proteínas de membrana plasmática mediante experimentos de biotinilación. a) Se transfectaron células HEK transitoriamente con  $A_{2A}R$  (carril 1), GPR37<sup>YFP</sup> (carril 2) o  $A_{2A}R$  y GPR37<sup>YFP</sup> (carril 3) y se procedió al marcaje con biotina de las proteínas de la superficie celular. Una vez realizado este proceso, se obtuvieron extractos celulares de cada muestra y se purificaron por precipitación por afinidad con streptavidina aquellas proteínas que habían incorporado biotina. Los extractos crudos (Whole cell) y los purificados (Cell surface) se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot (IB) usando anticuerpos policlonales contra  $A_{2A}R$  y GPR37. b) Los ratios entre expresión en superficie celular y total del receptor  $A_{2A}R$  se calcularon por cuantificación de sus bandas correspondientes. Los valores (media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes) se normalizaron, asignando el 100% a la muestra transfectada únicamente con  $A_{2A}R$ . El asterisco indica datos significativamente diferentes a esa referencia: \*  $p < 0.05$  por one simple t-test.

Dado que la coexpresión de  $A_{2A}R$  y GPR37 afectó la expresión en la superficie celular de ambos receptores, nos propusimos evaluar si estos cambios afectaban también a la

capacidad de señalización de los mismos. Al ser GPR37 un receptor huérfano, carente por tanto de agonista natural, decidimos inicialmente evaluar la influencia de la coexpresión de este receptor en la señalización mediada por A<sub>2A</sub>R.

Así, realizamos experimentos de acumulación de AMPc mediada por la activación de A<sub>2A</sub>R, una ruta de transducción de señal clásica de este receptor. Se usó como sistema de detección un gen reportero, la luciferasa, cuya transcripción estaba controlada por un elemento de respuesta sensible a AMPc (CRE). En estas condiciones, se determinó el efecto de la coexpresión de GPR37 sobre la generación de AMPc mediada por A<sub>2A</sub>R al ser activado con el agonista selectivo CGS21680 (Fig. 27).



**Fig. 27.** Ensayo de acumulación de AMPc. Células transfectadas transitoriamente con A<sub>2A</sub>R o con A<sub>2A</sub>R más GPR37 fueron estimuladas con un agonista del receptor de adenosina, CGS21680 (50 nM), y diferentes concentraciones del antagonista SCH-58261. Los resultados (n=3) se normalizaron a la respuesta obtenida con CGS21680 en células que expresaban solo A<sub>2A</sub>R. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a ese valor: \* p<0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 por ANOVA con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Como se puede observar en la figura, la expresión de GPR37 afectó la funcionalidad del A<sub>2A</sub>R. Así, la activación con el agonista CGS21680 produjo un efecto significativamente menor en células que coexpresaban el receptor huérfano (~ un 30% menos). Por su parte, células transfectadas únicamente con GPR37 no respondieron, como era esperable, a la presencia de CGS21680 (datos no mostrados).

Por otra parte, también se puede observar en la figura que la inhibición en la activación del receptor A<sub>2A</sub>R se vio afectada por la presencia de GPR37. Así, con la misma concentración de agonista, al añadir dos concentraciones diferentes del antagonista

SCH-58261 (5 y 200 nM, columnas rayadas y negras) observamos diferentes efectos de SCH-58261 inhibiendo la producción de AMPc mediada por CGS21680. Por una parte, en las células que expresaban A<sub>2A</sub>R el efecto del antagonista redujo los niveles de AMPc de manera significativa en las dos concentraciones de SCH-58261, pasando de un 100% a un 81% y un 59%, respectivamente, mientras que al coexpresar GPR37 con A<sub>2A</sub>R solo la incubación con SCH-58261 200 nM produjo un descenso significativo, aunque menor, en la acumulación de AMPc (Fig. 27).

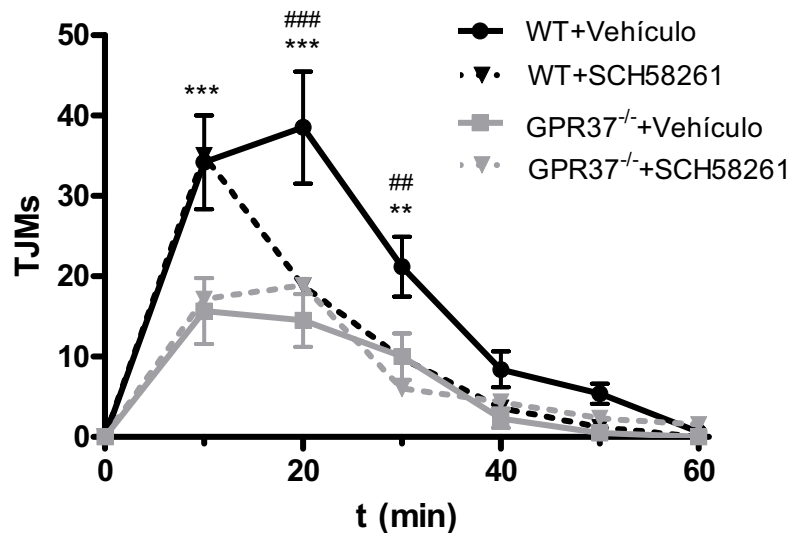
El conjunto de estos resultados demostró que la presencia de GPR37 interfiere en la expresión en membrana plasmática y la funcionalidad de A<sub>2A</sub>R, reduciendo su capacidad de activación en células en cultivo.

### *3.3. Interacción funcional: modelo animal*

Una vez demostrada la interacción funcional A<sub>2A</sub>-GPR37 en cultivos celulares, nos planteamos estudiar su impacto in vivo, comparando una cepa de ratón común (C57BL/6J; *wild-type*, WT) con animales transgénicos con el mismo fondo genético que no expresan GPR37 (GPR37<sup>-/-</sup>).

Dada la relación de ambos receptores con el sistema dopaminérgico, se quiso evaluar si la interacción entre A<sub>2A</sub>R y GPR37 afectaba al sistema motor, típicamente asociado a la función dopaminérgica. Para ello, en primer lugar, se implementó una prueba de movimientos temblorosos de mandíbula (*tremulous jaw movements*, TJM), que se definen como una desviación vertical de la mandíbula inferior que no está dirigida por ningún estímulo. Las características fisiológicas de este tipo de movimiento se asemejan a las del parkinsonismo (Salamone et ál., 1998), y por ello su inducción a través de diversas drogas y el posterior estudio de su atenuación con una amplia variedad de compuestos se ha usado como una de las aproximaciones en el descubrimiento de nuevos tratamientos contra el párkinson (Ishiwari et ál., 2004; Salamone et ál., 2008; Trevitt et ál., 2009).

En nuestro caso, empleamos el colinomimético pilocarpina para provocar estos TJM en nuestros animales (WT y GPR37<sup>-/-</sup>), como ya había sido descrito anteriormente (Collins et ál., 2010), en ausencia o presencia del antagonista de A<sub>2A</sub>R, SCH-58261.



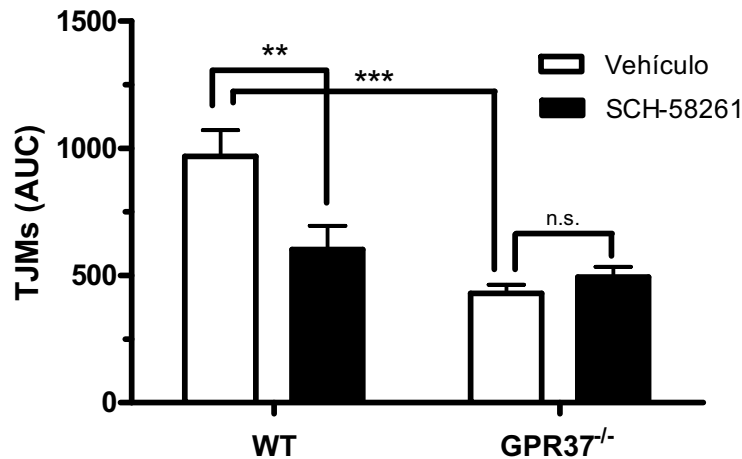
**Fig. 28.** Perfil de TjMs inducidos por pilocarpina (i.p., 0.5 mg/kg) en ratones WT o GPR37<sup>-/-</sup> (N=6) en función del tiempo. Se evaluó además el efecto de la administración de SCH-58261 (i.p., 1 mg/kg) o, alternativamente, vehículo. Los símbolos indican diferencias significativas entre los animales WT y GPR37<sup>-/-</sup> tratados con vehículo (\*) o entre la administración de vehículo y SCH-58261 en los animales WT (#): \*\*/## p < 0.01, \*\*\*/### p < 0.001 por ANOVA con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Como se puede observar en la figura 28, la acción de la pilocarpina varió considerablemente entre los animales WT y los GPR37<sup>-/-</sup>. Así, a los 20 minutos del inicio del experimento, el tiempo de máxima acción de la pilocarpina, hubo un efecto significativamente menor en los animales que no expresaban el receptor huérfano.

Por su parte, el tratamiento con el antagonista de A<sub>2A</sub>R solo fue capaz de reducir el número de temblores en el animal WT, mientras que en el animal GPR37<sup>-/-</sup> no pareció tener efecto.

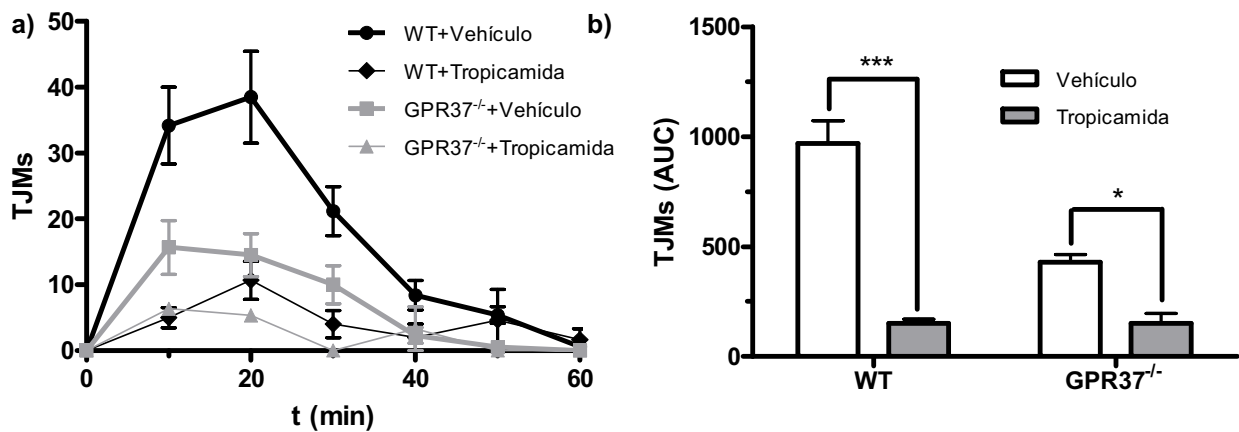
Estas diferencias se observaron más claramente al representar el área bajo la curva de cada tratamiento para el tiempo total del experimento (Fig. 29). Esta representación de los datos nos mostró que, efectivamente, el efecto de SCH-58261 hizo disminuir significativamente el número de movimientos temblorosos únicamente en el caso de los animales WT.





**Fig. 29.** Representación del área bajo la curva (AUC) de los perfiles de TJM observados en la figura 13. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  por ANOVA con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

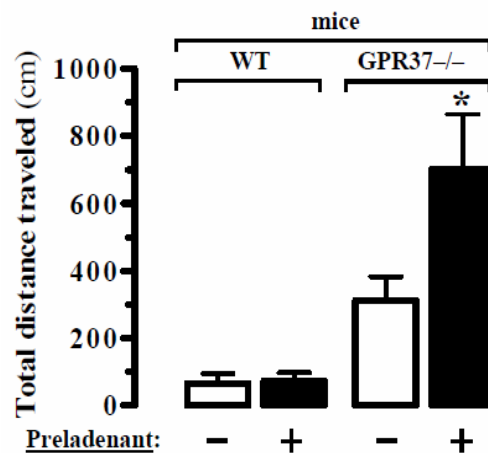
Como control en esta prueba experimental, se usó también un antagonista muscarínico, la tropicamida, en combinación con la pilocarpina. Bajo estas condiciones, se consiguió reducir la aparición de TJMs de manera significativa en los dos tipos de animales (Fig. 30), con lo que nos pudimos asegurar que, aunque con un menor rango dinámico, era posible disminuir también los movimientos de mandíbula en los animales GPR37<sup>-/-</sup>.



**Fig. 30.** Efecto de la tropicamida sobre los TJM inducidos por pilocarpina. a) Perfil de TJMs en ratones WT o GPR37<sup>-/-</sup> en función del tiempo. Se indujeron los movimientos por la coadministración de pilocarpina (0.5 mg/kg) junto a tropicamida (2.5 mg/kg) o, alternativamente, vehículo. b) Representación del área bajo la curva (AUC) de los TJM observados. Los asteriscos indican diferencias significativas: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  por ANOVA con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

En segundo lugar, de forma parecida al test de TJM, evaluamos la actividad locomotora de estos animales, clásicamente asociada también al sistema dopaminérgico. De esta forma, medimos la distancia recorrida durante 5 minutos por nuestros animales en una

prueba de campo abierto. Los resultados obtenidos muestran que los animales GPR37<sup>-/-</sup> tuvieron un comportamiento exploratorio mayor que los ratones WT, si bien este no fue estadísticamente significativo (Fig. 31). Estos datos apuntan a un posible papel de GPR37 sobre la actividad motora, que se confirmaron al administrar un antagonista de A<sub>2A</sub>R. Así, la administración por vía oral de preladenant (SCH-420814) permitió observar que, a diferencia de lo descrito para otros antagonistas de A<sub>2A</sub>R (El Yacoubi et ál., 2000), el fármaco no tuvo efecto en los animales WT, hecho ya descrito anteriormente (Hodgson et ál., 2009). Sin embargo, en los animales GPR37<sup>-/-</sup> el preladenant indujo un aumento significativo de la actividad locomotora (Fig. 31).



**Fig. 31.** Efectos del antagonista de A<sub>2A</sub>R preladenant sobre la actividad locomotora de animales WT y GPR37<sup>-/-</sup>. Se administró a los ratones (N=6) preladenant (oral, 0.5 mg/kg) o vehículo y se contó la distancia recorrida durante cinco minutos en experimentos de campo abierto. \* p < 0.05 por ANOVA con test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

En su conjunto, los ensayos realizados en ratones C57BL/6J comunes (WT) y de la cepa GPR37<sup>-/-</sup> nos revelaron que, al igual que en los experimentos en cultivo celular, la administración de un antagonista de A<sub>2A</sub>R (SCH-58261 por vía intraperitoneal o preladenant por vía oral) provocó diferentes efectos en función de la presencia o ausencia del receptor GPR37.

El conjunto de los resultados obtenidos en los apartados 2 y 3 forman parte de una publicación conjunta, coordinada por el Dr. Igor Stagljär, que con el título provisional “Systematic interactome building of 50 clinically relevant human GPCRs: a resource for cell signalling research” se encuentra en proceso de presentación a la revista “Molecular systems biology”.

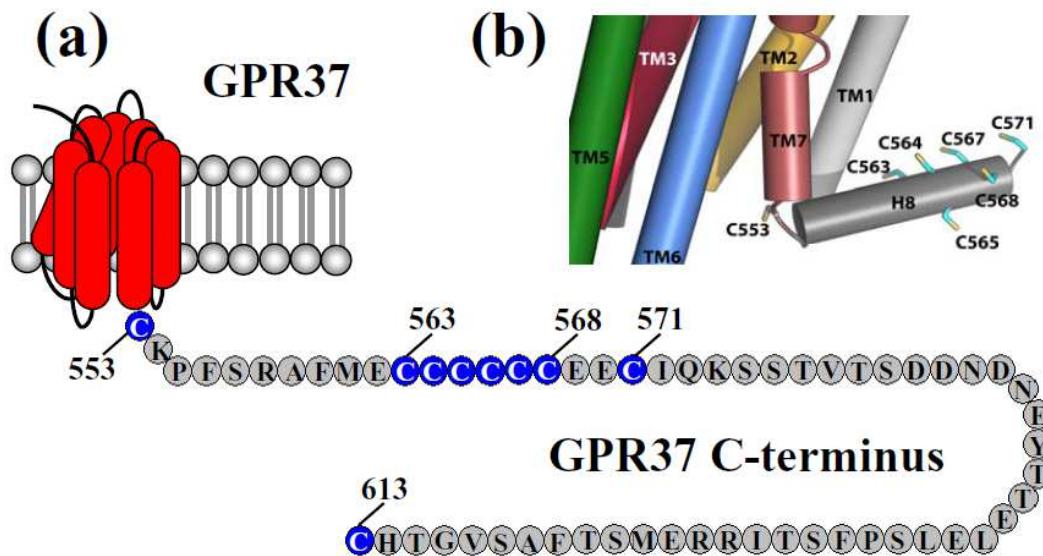
#### **4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL RECEPTOR HUÉRFANO GPR37**

Una vez confirmada la interacción molecular y funcional entre A<sub>2A</sub>R y GPR37, quisimos caracterizar los determinantes moleculares que intervienen en dicha interacción. En primer lugar, sin embargo, fue preciso caracterizar estructuralmente el receptor huérfano, ya que a pesar de haberse establecido una buena correlación entre la expresión de GPR37 y la enfermedad de Parkinson, se conoce muy poca información estructural y funcional de este receptor huérfano. Por ejemplo, aunque GPR37 tiene una homología significativa (40%) con los GPCR de clase A activados por péptidos (en concreto, con los receptores B de endotelina, BB1 y BB2 de bombesina) (Marazziti et ál., 1997; 1998), sus agonistas no son capaces de activar a GPR37 (Leng et ál., 1999; Valdenaire et ál., 1998; Zeng et ál., 1997). En este sentido, la información sobre ligandos específicos para GPR37 es todavía escasa. Sin embargo, se ha descrito que el neuropéptido *head activator* (HA) es un ligando de alta afinidad para el receptor (Rezgaoui et ál., 2006), no sin controversia (Dunham et ál., 2009). A pesar de que algunas publicaciones anteriores a estos estudios habían sugerido que el péptido HA está presente en el cerebro humano y con un papel potencial en algunos tipos de tumor cerebral, no se ha identificado ningún equivalente a HA en vertebrados, dejando así abierta la posibilidad de una versión humana de este péptido. Por otra parte, recientemente se han propuesto dos nuevos ligandos como posibles activadores tanto de GPR37 como de su homólogo GPR37L1. Se trata del factor neuro y glioprotector prosaposina y un derivado peptídico de este, el prosaptide (Meyer et ál., 2013). De manera similar, la información estructural sobre GPR37 es muy reducida. Así, básicamente se ha descrito que el receptor tiene una inherente dificultad a la hora de plegarse (Imai et ál., 2001), hecho que complica su expresión ectópica en células y su tráfico a membrana plasmática. En un estudio realizado paralelamente a nuestros experimentos, se observó que la delección de los extremos extra e intracelulares afectaba a la expresión de GPR37 en la superficie celular (Dunham et ál., 2009).

##### *4.1. Expresión en la membrana plasmática de GPR37 y su regulación a través del dominio C-terminal rico en cisteínas*

A partir de los antecedentes descritos en la literatura, y del hecho de que modificaciones postraduccionales covalentes en los residuos de cisteína en GPCRs afectan tanto al

tráfico de proteínas (Greaves y Chamberlain, 2007) como al acoplamiento de la proteína G y, por lo tanto, a la eficacia de la señalización (Chini y Parenti, 2009), quisimos estudiar la influencia de la cola intracelular del receptor en su localización celular. En la secuencia de aminoácidos de este extremo de GPR37 pudimos localizar, entre otros, una región con seis cisteínas consecutivas (de las posiciones 563 a 568, Fig. 32).

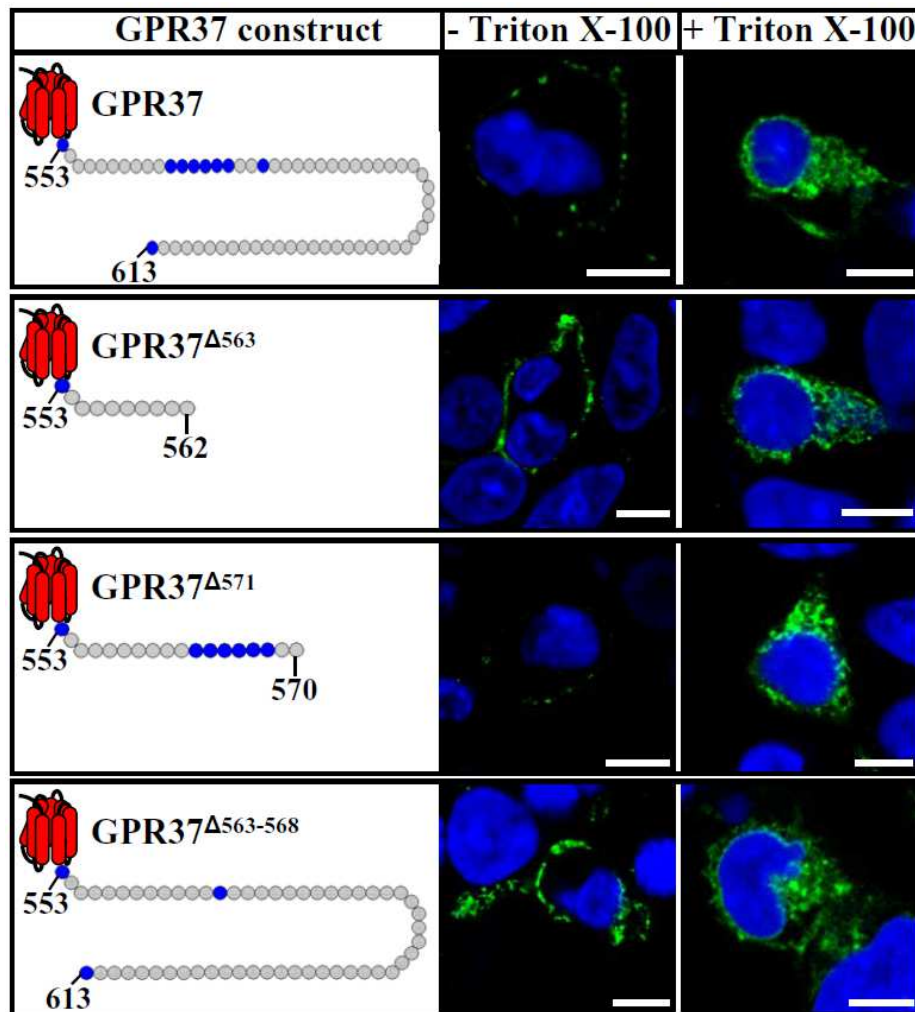


**Fig. 32.** GPR37 y su cola C-terminal. a) Representación esquemática de la cola C-terminal de GPR37. Los residuos de cisterna en esta región se resaltaron en azul, indicándose además el número de residuo al cual corresponden. b) Modelo molecular de la parte intracelular de GPR37, construida a partir de la estructura cristalina de A2AR (Dunham et. al, 2009). El modelo muestra que el residuo Cys553 se encuentra dentro del conector entre el dominio transmembrana TM7 y la hélice H8, mientras que los aminoácidos comprendidos entre Cys563 y Cys571 forman parte de H8. Los aminoácidos de la cola C-terminal, desde Ile571 hasta Cys563, no fueron modelados.

Nos planteamos analizar, por tanto, si esta secuencia rica en cisteínas jugaba algún papel en el tráfico celular de GPR37. Para tal fin, se generaron diversos mutantes por delección (Fig. 33) y analizamos en células transfectadas transitoriamente con estas construcciones el tráfico a membrana plasmática mediante dos técnicas: experimentos de inmunocitoquímica y ensayos de biotilación de la superficie celular. Así, se pudo observar que, mientras que células no permeabilizadas mostraron una expresión superficial de GPR37 limitada, una gran cantidad del mismo se observó a nivel intracelular en muestras permeabilizadas (Fig. 33). Un resultado similar se obtuvo para la variante de GPR37 en la que faltaban los últimos 40 aminoácidos (GPR37<sup>Δ571</sup>). Sin embargo, al eliminar los últimos 48 residuos (GPR37<sup>Δ563</sup>), perdiendo por consiguiente el dominio rico en cisteínas, el receptor mostró una marcada expresión en superficie celular, en comparación con GPR37. Además, la eliminación específica de los seis residuos de cisteína (GPR37<sup>Δ563-568</sup>) también promovió un mayor tránsito del receptor hacia la membrana plasmática, sugiriendo que la presencia de este dominio rico en

## Resultados

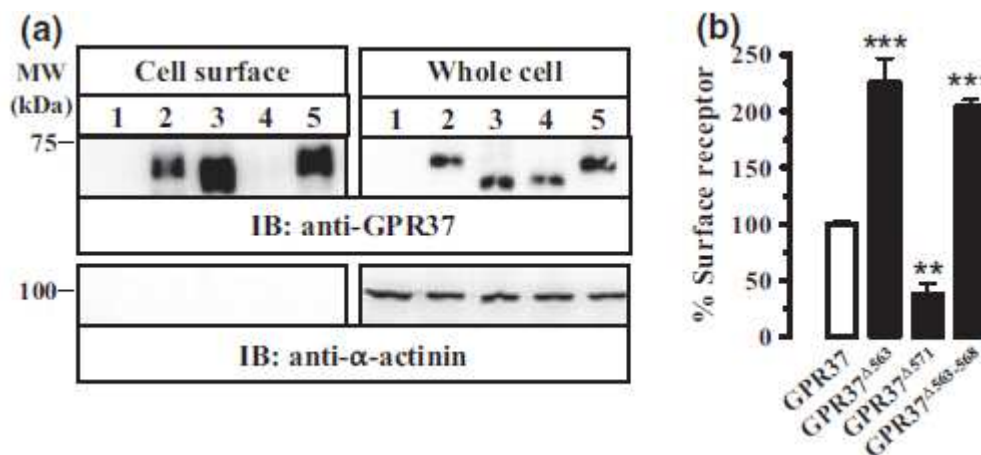
cisteínas en el extremo carboxiterminal del receptor limitaba su localización específica en la superficie celular (Fig. 33).



**Fig. 33.** GPR37 y sus mutantes en la cola C-terminal: detección por inmunocitoquímica de las construcciones de GPR37. Células HEK crecidas sobre cubreobjetos de cristal fueron transfectadas transitoriamente con los ADNc que codificaban para GPR37, GPR37 $\Delta$ 563, GPR37 $\Delta$ 571 y GPR37 $\Delta$ 563-568 y procesadas para inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-GPR37 (2  $\mu$ g/mL). Este anticuerpo primario unido fue detectado mediante un anticuerpo anti-conejo de cabra, conjugado a AlexaFluor488 (1:2000). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Finalmente, las células se analizaron por microscopía confocal para detectar GPR37 (verde) y núcleos (azul). La barra de escala representa 10  $\mu$ m

Para corroborar la hipótesis de que el dominio rico en cisteínas controla la expresión en membrana plasmática de GPR37, llevamos a cabo ensayos de biotilación de la superficie celular. Así, aislamos el GPR37 presente en membrana plasmática usando un éster de biotina impermeable a membrana, en combinación con una purificación de proteínas de membrana por afinidad a estreptavidina-agarosa. Como se observa en la figura 34, las construcciones de GPR37 en las que está ausente el dominio rico en cisteínas (i.e. GPR37 $\Delta$ 563 y GPR37 $\Delta$ 563-568) presentaron una proporción de receptor en membrana plasmática (respecto al total celular) que fue aproximadamente el doble que la del GPR37 nativo. Por su parte, y en las mismas condiciones experimentales, la

construcción de GPR37 que sí contenía la región de cisteínas (GPR37<sup>Δ571</sup>) mostró una marcada reducción de su expresión en la superficie celular.



**Fig. 34.** Detección en superficie celular de las construcciones de GPR37. a) Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con pcDNA3 (carril 1), GPR37 (carril 2), GPR37<sup>Δ563</sup> (carril 3), GPR37<sup>Δ571</sup> (carril 4) y GPR37<sup>Δ563-568</sup> (carril 5). El marcaje de proteínas de la superficie celular se realizó como se describe en Gandía et al., 2013. Los extractos celulares crudos (Whole cell) y las proteínas biotinizadas (Cell surface) se analizaron por SDS-PAGE y se inmunodetectaron usando un anticuerpo policlonal anti-GPR37 (1 µg/mL) o un anticuerpo policlonal anti-actinina (0.2 µg/mL) como control para descartar el marcaje de proteínas citoplasmáticas. b) Cuantificación de la expresión en superficie celular de las construcciones de GPR37. Se calcularon los ratios de la expresión del receptor entre la membrana plasmática y el total de la célula para cada construcción y se normalizaron estos valores, asignando el 100% a la forma nativa de GPR37. Los datos se expresan como la media ± desv. est. de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de la construcción GPR37: \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

Para concluir que el marcaje por biotina se produjo solo en la membrana plasmática se intentó detectar una proteína intracelular (en este caso,  $\alpha$ -actinina) en la fracción purificada por afinidad, con resultado negativo (Fig. 34).

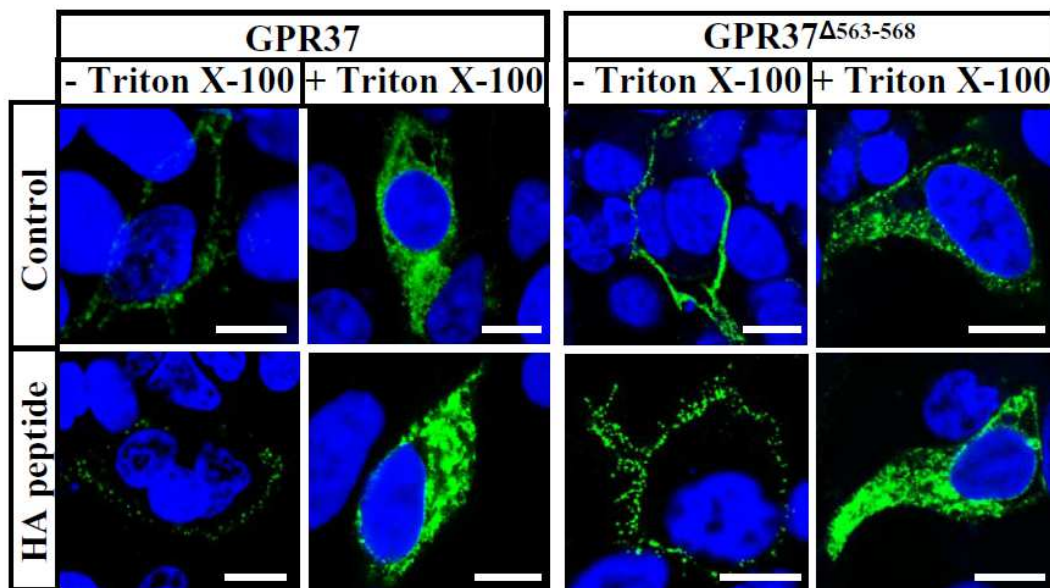
En conjunto, estos resultados nos permitieron concluir que el dominio rico en cisteínas del receptor GPR37 parece jugar un papel fundamental en el control del tráfico de GPR37 hacia la membrana plasmática.

#### 4.2. Consecuencias funcionales de la eliminación del dominio rico en cisteínas

A continuación, nos propusimos evaluar si el neuropéptido HA, agonista putativo del receptor, era capaz de activar GPR37 y si la ausencia del dominio rico en cisteínas afectaba a la funcionalidad del receptor. Por esta razón, para los siguientes experimentos decidimos comparar específicamente la forma nativa de GPR37 con GPR37<sup>Δ563-568</sup>, ya que esta última no difería en su expresión de membrana plasmática de la construcción

sin toda la cola intracelular (GPR37<sup>Δ563</sup>). Además, al ser una forma menos truncada que esta, la funcionalidad del receptor se vería potencialmente menos afectada.

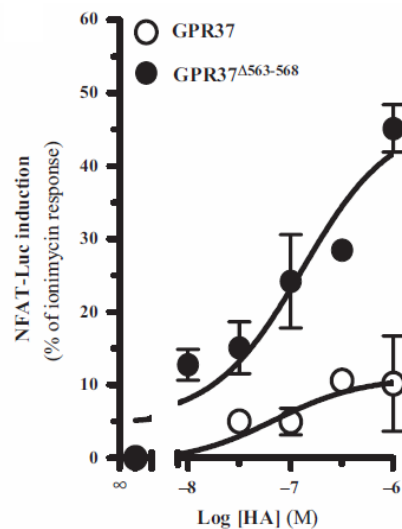
En primer lugar, medimos la capacidad del neuropéptido HA de inducir la internalización de GPR37, fenómeno anteriormente ya descrito (Rezgaoui et ál., 2006). Para ello, células transfectadas transitoriamente con GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup> fueron incubadas con el neuropéptido HA y la distribución del receptor se analizó por inmunocitoquímica tanto en células permeabilizadas como en no permeabilizadas. De manera destacada, el tratamiento con HA indujo en ambas transfecciones un agrupamiento del receptor en la membrana plasmática, como muestra la pronunciada distribución punteada en las células no permeabilizadas (Fig. 35). Además, el tratamiento con HA indujo la translocación de ambas formas del receptor hacia el citoplasma, al poder observar un aumento de agregados intracelulares tras dicha incubación (Fig. 35).



**Fig. 35.** Internalización de GPR37 mediada por el péptido HA. Células HEK293 crecidas sobre cubreobjetos de cristal se transfectaron transitoriamente con las construcciones GPR37 y GPR37<sup>Δ563-568</sup>, tratadas con vehículo (control) o con una concentración 1 μM de HA (HA peptide) durante 60 min y procesadas para inmunocitoquímica usando un anticuerpo policlonal anti-GPR37 (2 μg/mL). El anticuerpo primario unido fue detectado mediante un anticuerpo anti-conejo de cabra, conjugado a AlexaFluor488 (1:2000). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las células se analizaron mediante microscopía confocal para detectar GPR37 (verde) y los núcleos (azul). La barra de escala representa 10 μm.

En conjunto, pudimos concluir que el dominio rico en cisteínas de GPR37 no afecta al agrupamiento en superficie celular del receptor mediado por HA ni a su internalización. A continuación, se analizó la funcionalidad del receptor midiendo los cambios en el calcio intracelular, dado que ya se había descrito previamente que estos podían ser

mediados por la estimulación con HA (Rezgaoui et ál., 2006). Con este fin, células HEK293 se transfectaron transitoriamente con GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup>, más el vector pGL4-NFAT-RE/luc2p, que codifica la expresión de una luciferasa como gen reportero bajo el control de un elemento de respuesta al factor de transcripción NFAT, dependiente de calcio. Así, estas células fueron incubadas con concentraciones crecientes del neuropéptido HA y se obtuvieron curvas dosis-respuesta (Fig. 36). Analizando estas curvas pudimos observar que, mientras que la EC<sub>50</sub> se mantuvo en el mismo rango (69 ± 25nM y 129 ± 54 nM, respectivamente), la respuesta máxima fue significativamente diferente (11 ± 3% y 46 ± 5%, respectivamente). Por su parte, las células transfectadas con un vector control vacío no mostraron acumulación de calcio tras la incubación con HA (datos no mostrados).



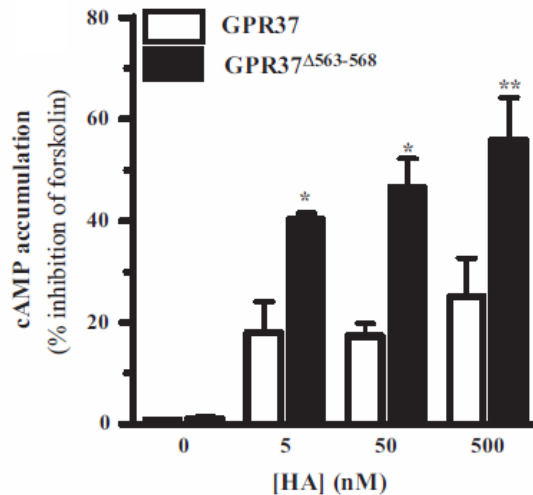
**Fig. 36.** Funcionalidad de las construcciones de GPR37 (I). Los cambios en el calcio citoplasmático mediados por receptor se midieron usando un método basado en luminiscencia. Se obtuvo una curva dosis-respuesta para células HEK293 transfectadas con GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup> usando el péptido HA como agonista. Los resultados se representaron como porcentaje de la respuesta celular producida por ionomicina 1  $\mu$ M. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes.

En resumen, estos resultados mostraron que la eliminación del dominio rico en cisteínas de GPR37 promueve la acumulación de calcio intracelular mediada por este receptor.

Finalmente, también evaluamos los efectos del neuropéptido HA en la generación de AMPc mediada por la adenilato ciclasa (AC), dado que se ha descrito que GPR37 mediaría su respuesta a HA a través de G<sub>i</sub> (Rezgaoui et ál., 2006). Así, comprobamos si la estimulación con diferentes concentraciones de HA inducía la inhibición de AC



mediada por GPR37 en células transfectadas transitoriamente con este receptor e incubadas con forskolina. Tal como sucedió con la acumulación de calcio intracelular, la ausencia del dominio rico en cisteínas promovió una mayor inhibición de AC mediada por el receptor (Fig. 37). En las mismas condiciones, el neuropéptido HA no consiguió este efecto en células transfectadas con un vector vacío (datos no mostrados).



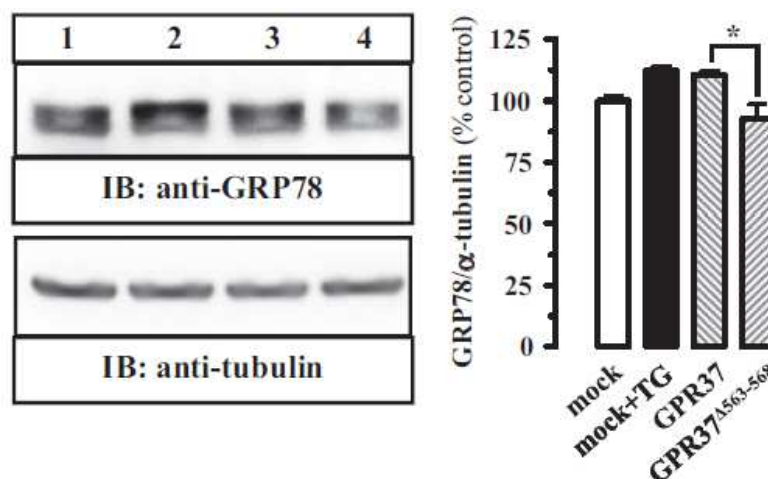
**Fig. 37.** Funcionalidad de las construcciones de GPR37 (II). Se evaluó la inhibición de la AC mediada por GPR37 y GPR37 $\Delta$ 563-568. Células HEK293 se transfectaron con estas construcciones y se estimularon con forskolina 1  $\mu$ M y diferentes concentraciones de HA. A continuación, se determinó la concentración de AMPc usando el ensayo cAMP-Glo<sup>TM</sup> de Promega. El descenso en la producción de AMPc se representa como un porcentaje de la respuesta obtenida por forskolina sola. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican datos significativamente diferentes de la construcción GPR37: \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

En conjunto, los datos obtenidos indicaron que la eliminación del dominio rico en cisteínas promovía la transducción de señal de GPR37, un fenómeno que puede ser consecuencia del incremento de la expresión en la membrana plasmática del receptor o de un mejor acoplamiento a la proteína G.

#### 4.3. Papel del dominio rico en cisteínas en el estrés de retículo endoplasmático inducido por GPR37

Se ha demostrado que la acumulación intracelular de GPR37 en neuronas dopaminérgicas provoca estrés en el retículo endoplasmático (RE) (Imai et ál., 2001; Kitao et ál., 2007). Dado que la eliminación del dominio rico en cisteínas facilitó el tráfico del receptor a la membrana plasmática, quisimos comprobar el papel de este dominio en el estrés de retículo mediado por GPR37.

Para ello, analizamos el efecto de GPR37 en la expresión de GRP78, un asistente de plegamiento de proteínas en ER. Esta chaperona es un importante regulador del estrés de retículo (Lee, 2005) y, de hecho, se ha demostrado que aumenta su presencia al iniciarse ese proceso. Por lo tanto, transfectamos transitoriamente células HEK293 con GPR37 y GPR37<sup>Δ563-568</sup>, y evaluamos la expresión de GRP78 por inmunodetección (Fig. 38). Como era esperable, el tratamiento con thapsigargina, un inhibidor de las Ca<sup>2+</sup>-ATPasas sarcoendoplásmicas, aumentó la expresión de GRP78. De una manera parecida, las células transfectadas con GPR37 mostraron un incremento significativo de GRP78 (110 ± 1.7%,  $p < 0.05$ ) comparado con células control sin tratar. Sin embargo, las células transfectadas con GPR37<sup>Δ563-568</sup> no mostraron este aumento en la expresión de GRP78, cuyos niveles fueron significativamente diferentes de los observados en las células transfectadas con GPR37 (Fig. 38).

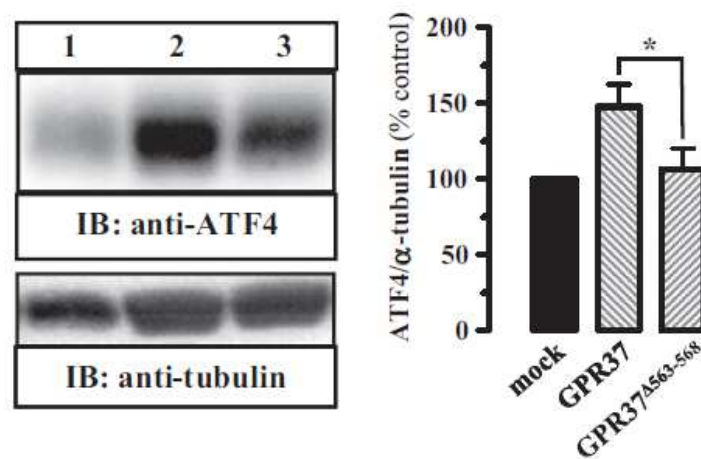


**Fig. 38.** Expresión de GPR37 y estrés de RE (I): efecto de la expresión de GPR37 sobre GRP78. Células HEK293 se transfectaron transitoriamente con un vector vacío (carriles 1 y 2), GPR37 (carril 3) y GPR37<sup>Δ563-568</sup> (carril 4). Las células transfectadas con el vector vacío se trataron con thapsigargina 1 μM (TG) durante 6h como control de la expresión inducida de GRP78 (carril 2). Se obtuvieron lisados celulares, que fueron analizados por SDS-PAGE e inmunodetectados utilizando un anticuerpo policlonal anti-GRP78 (1 μg/mL) o un anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina (0.2 μg/mL) como control de carga de proteína. Las bandas obtenidas se cuantificaron y se representaron los ratios entre GRP78 y α-tubulina y se normalizaron los valores, asignando el 100% a la muestra de vector vacío sin tratar. Los datos se expresan como la media ± desv. est. de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas entre los datos comparados: \*  $p < 0.05$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

Tras iniciarse el estrés de retículo, GRP78 es liberado por transductores de señal en la membrana del ER y esto lleva a la activación de las vías de señalización de la respuesta a proteínas no plegadas (*unfolded protein response*, UPR). Un efector en posteriores etapas de una de estas vías es el activador de factor de transcripción 4 (ATF4), cuya

## Resultados

traducción se incrementa durante el estrés de retículo (Harding et ál., 2000). Por consiguiente, quisimos comprobar si la expresión de ATF4 se alteraba por GPR37. Transfectamos transitoriamente células HEK293 con GPR37 y cuantificamos por inmunodetección la expresión de ATF4 (Fig. 39). Los resultados muestran que en estas células se produjo un aumento significativo de ATF4 ( $147 \pm 14\%$ ,  $p < 0.05$ ), en comparación con las células transfectadas con un vector control, sugiriendo así que la expresión de GPR37 promovía el aumento de ATF4. Por su parte, bajo las mismas condiciones experimentales, células transfectadas con GPR37<sup>Δ563-568</sup> no mostraron un aumento significativo en la expresión de ATF4 y esta a su vez fue significativamente diferente de la observada en las células transfectadas con GPR37 (Fig. 39).



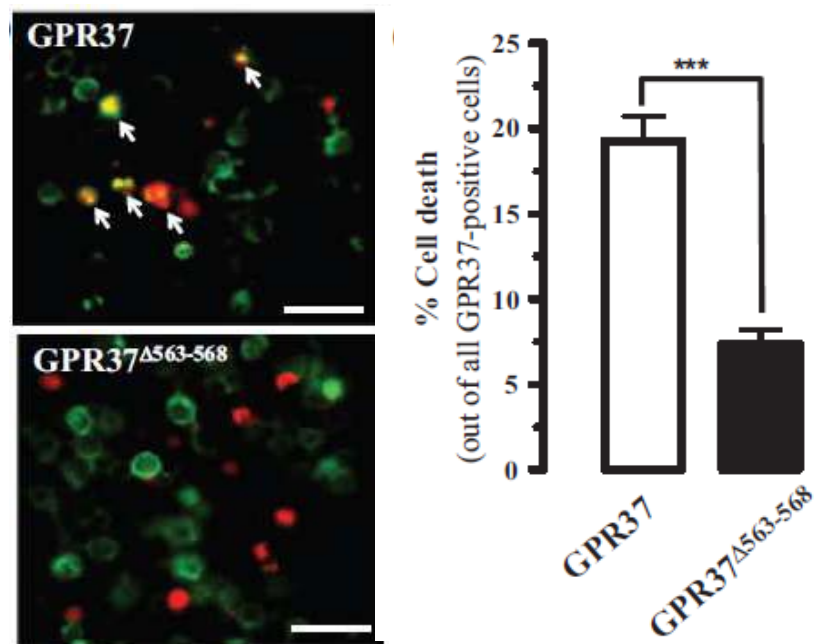
**Fig. 39.** Expresión de GPR37 y estrés de RE (II): efecto de la expresión de GPR37 sobre ATF4. Células HEK293 se transfectaron transitoriamente con un vector vacío (carril 1), GPR37 (carril 2) y GPR37<sup>Δ563-568</sup> (carril 3) y se trataron con thapsigargina 1  $\mu$ M (TG) durante 6h. Se obtuvieron lisados celulares, que fueron analizados por SDS-PAGE e inmunodetectados utilizando un anticuerpo policlonal anti-ATF4 (1  $\mu$ g/mL) o un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulina (0.2  $\mu$ g/mL) como control de carga de proteína. Las bandas obtenidas se cuantificaron, se calcularon los ratios entre ATF4 y  $\alpha$ -tubulina y se normalizaron los valores, asignando el 100% a la muestra de vector vacío. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas entre los datos comparados: \*  $p < 0.05$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

Globalmente, estos resultados apoyan la hipótesis de que el dominio rico en cisteínas de GPR37 está involucrado tanto en la inducción mediada por receptor de la expresión de GRP78 como en el aumento de ATF4 tras el inicio del estrés de retículo.

#### 4.4. Papel del dominio rico en cisteínas en la citotoxicidad mediada por GPR37

Finalmente, dada la relación entre GPR37 y las vías UPR, que pueden llevar a respuestas apoptóticas (Szegezdi et ál., 2006), nos propusimos estudiar el papel del dominio rico en cisteínas en la toxicidad mediada por receptor.

Para ello, hicimos inicialmente una evaluación del efecto de GPR37 en la viabilidad celular con una tinción fijable de muerte celular que fue aplicada en nuestros experimentos de inmunocitoquímica. De esta manera, pudimos identificar células positivas para ambos marcadores (i.e. muerte celular y expresión de receptor) y cuantificar así el alcance del daño en ese subgrupo concreto de células. Observamos que esta proporción fue significativamente diferente, en función de si la expresión correspondía a GPR37 o a GPR37<sup>Δ563-568</sup> ( $19.2 \pm 4.3\%$  y  $7.4 \pm 2.4\%$ , respectivamente), sugiriendo por lo tanto que el daño celular mediado por GPR37 depende del dominio rico en cisteínas (Fig. 40).



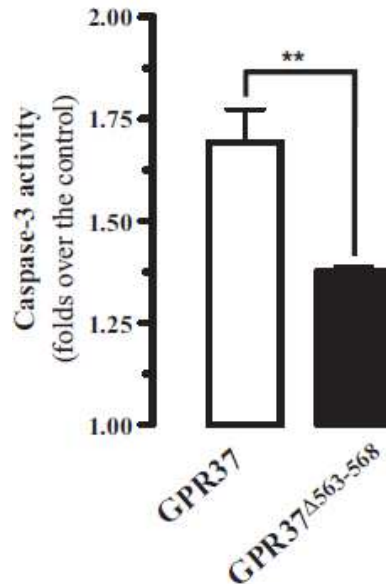
**Fig. 40.** Efecto de la expresión de GPR37 sobre la viabilidad celular (I). Las imágenes de microscopio muestran células que expresan GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup> (verde) y células que han entrado en el proceso de muerte celular (rojo). Las células que son positivas para ambas condiciones se han destacado con una flecha. En estas condiciones, la subpoblación de células muertas y que expresan GPR37 se cuantificaron para cada construcción y se representaron como el porcentaje del total de células transfectadas. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas con la forma nativa de GPR37: \*\*\*  $p < 0.001$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

Además de la prueba de viabilidad celular, también estudiamos efectos específicos en la vía apoptótica, determinando la actividad de la caspasa 3 tras la expresión de GPR37 o de GPR37<sup>Δ563-568</sup>.

Para este fin, usamos un sustrato fluorogénico de caspasa 3 para determinar la actividad de esta proteasa en lisados de células transfectadas con cada forma del receptor. La fluorescencia generada por la acción de la enzima se normalizó a una muestra control obtenida de células transfectadas con un vector control. Así, pudimos observar que, de manera similar a la prueba de viabilidad celular, las células

## Resultados

transfectadas con la forma nativa de GPR37 mostraron una actividad de caspasa 3 significativamente mayor que las que expresaban GPR37<sup>Δ563-568</sup> ( $1.7 \pm 0.2$  veces y  $1.3 \pm 0.03$  veces, respectivamente), indicando que la apoptosis mediada por GPR37 depende de alguna manera del dominio rico en cisteínas (Fig. 41).



**Fig. 41.** Efecto de la expresión de GPR37 sobre la viabilidad celular (II): determinación de la actividad de la caspasa 3. Se obtuvieron lisados de células transfectadas con GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup> y cantidades de proteína iguales de cada muestra se incubaron con un sustrato fluorogénico de caspasa 3. La fluorescencia generada se midió y normalizó al valor obtenido en células transfectadas con un vector vacío. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. El asterisco indica diferencias significativas con la forma nativa de GPR37: \*\*\*  $p < 0.001$  mediante ANOVA con test Student-Newman-Keuls *post hoc* para comparaciones múltiples.

Por lo tanto, estos resultados demostraron la importancia del papel del dominio rico en cisteínas de GPR37 en los efectos citotóxicos asociados a la expresión del receptor.

El conjunto de resultados de este cuarto apartado conformó un artículo titulado “The Parkinson’s disease-associated GPR37 receptor-mediated cytotoxicity is controlled by its intracellular cysteine-rich domain”, que fue presentado y publicado en la revista “Journal of Neurochemistry” (Anexo III).

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



Tras la resistencia inicial a aceptar la existencia de oligómeros de GPCR por parte de la comunidad científica, actualmente se empieza a considerar un fenómeno común de la biología de estos receptores (Terrillon y Bouvier, 2004; George et ál., 2002). Así, los GPCR no se pueden considerar como elementos funcionales aislados, sino que deben ser vistos como parte de complejos multiproteicos localizados en la membrana plasmática. Estos complejos de receptores con otras proteínas, que pueden ser no solo receptores sino también proteínas de señalización y de andamiaje, serían los responsables de la integración molecular y funcional de la señalización del receptor. Se postula por tanto que, como parte de este “receptorsoma”, los oligómeros de receptores juegan un papel clave tanto en la activación de señales como también en la orquestación de fenómenos moleculares que resultan en cambios asociados a la plasticidad de esas señales

En la última década, la homodimerización de los receptores  $A_{2A}$  ha sido demostrada mediante el uso de aproximaciones bioquímicas y biofísicas (Canals et ál., 2004). Cabe destacar aquí que, por medio de experimentos de biotilación de la superficie celular, se demostró que cerca de un 90% de  $A_{2A}R$  en la membrana plasmática existían como estructuras homodiméricas, apuntando a esta forma como la funcionalmente presente en la superficie de la célula.

Los primeros experimentos de esta Tesis estuvieron dirigidos a estudiar la homodimerización del receptor de adenosina  $A_{2A}$  y la posible formación de oligómeros de orden superior a dos. De esta manera, desarrollamos una nueva herramienta para identificar estos complejos multiproteicos, como es el ensayo de BiFC combinado con la técnica de BRET. De forma interesante, la aproximación experimental de BiFC, usada mayoritariamente en sus inicios en el área de la investigación en plantas (Hink et ál., 2003), permite la visualización directa de interacciones entre proteínas en células vivas, constituyendo una herramienta importante para la identificación y caracterización de este tipo de interacciones. Así, mediante el uso de esta técnica corroboramos la presencia de homodímeros en la membrana plasmática. Por otra parte, es interesante comentar que la distribución subcelular del homodímero  $A_{2A}R$  no fue aparentemente diferente de aquella observada para el receptor  $A_{2A}R$  total, sugiriendo que o bien todas las formas del receptor son homodiméricas, o bien que no existen diferencias en la distribución subcelular de sus diversas configuraciones (v.g. monómeros, homodímeros). Estos resultados son consistentes con otros obtenidos en un estudio relacionado (Bridson et ál., 2008), en el que por la combinación de las técnicas de BiFC y espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) pudimos obtener los coeficientes de difusión de  $A_{2A}R$  en



## Discusión

membrana plasmática de células que expresaban  $A_{2A}R^{YFP}$  o la combinación  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ . Ambos coeficientes de difusión resultaron ser muy similares, de manera que la forma homodimérica parecía tener las mismas características que el global de receptores (Bridson et ál., 2008).

Probar la existencia de oligómeros de mayor orden fue lo que nos motivó a combinar por fin las técnicas de BiFC y BRET. Así, con esta nueva aproximación experimental fuimos capaces de identificar oligómeros de  $A_{2A}R$  formados por más de dos protómeros. En primer lugar, por tanto, usamos esta aproximación para detectar homómeros de orden superior a dos formados por  $A_{2A}R$ . Cabe comentar sin embargo que, como ya hemos comentado en los resultados, los valores de BRET combinado con BiFC obtenidos para el complejo  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  difirieron de la curva resultante del BRET para  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$ . Estos cambios se podrían explicar teniendo en cuenta diferentes factores. En primer lugar, la menor eficiencia en la emisión de fluorescencia por la YFP complementada tiene como consecuencia una menor presencia de la molécula aceptora, de manera que el sistema de transferencia de energía se ve limitado. Por otra parte, al estar cotransfectando tres formas distintas del receptor, el número de oligómeros aptos para que ocurra el BRET (i.e.  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ), se vería afectado por la presencia de un mayor número de complejos no aptos para esa transferencia de energía (v.g.  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{C-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ , etc.) en comparación a las combinaciones de este tipo que surgen en un ambiente cotransfectado solo con dos construcciones  $A_{2A}R$  (las fusionadas a *Rluc* e YFP). Finalmente, mientras que se conocen ciertos aspectos moleculares de los dominios del  $A_{2A}R$  que median en el fenómeno de dimerización (Canals et ál., 2004), la adición de un tercer protómero nos indicaría que existen otras zonas donde es posible el contacto receptor-receptor. Sin embargo, el hecho de que el valor de  $BRET_{50}$  en la combinación BRET/BiFC fuera diferente, nos indicaría que estas otras regiones de interacción no son tan favorables o, incluso, que se estarían produciendo fenómenos de cooperatividad negativa. En definitiva, a pesar de que nuestros resultados indicaron pueden formarse oligómeros de  $A_{2A}R$  compuestos por más de dos protómeros, ésta no parece ser la estructura más favorable, mientras que la formación del homodímero sí estaría favorecida.

La determinación de la existencia de oligómeros compuestos por más de dos protómeros de  $A_{2A}R$  nos llevó a pensar que podría tratarse de un fenómeno generalizado a toda la superfamilia de los GPCR. Continuando con el trabajo iniciado con  $A_{2A}R$ , quisimos

determinar si se formaban oligómeros de este receptor con los receptores D<sub>2</sub> de dopamina (D<sub>2</sub>R) y metabotrópico 5 de glutamato (mGlu<sub>5</sub>R), dado que estos tres GPCR presentan una elevada codistribución en el estriado. A nivel subcelular, se localizan en la membrana postsináptica (en su región perisináptica) de neuronas GABAérgicas y se han descrito extensamente las interacciones funcionales de carácter antagonista entre A<sub>2A</sub>R y D<sub>2</sub>R (Fuxe et ál., 2007), y de tipo sinérgico entre A<sub>2A</sub>R y mGlu<sub>5</sub>R, conformando un gran número de indicios que sugieren la existencia del oligómero A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R (Popoli et ál., 2001). Este complejo multiproteico, además, en el contexto del tejido nativo representaría una entidad con una capacidad muy fina para modular las distintas señales que recibe el estriado, por lo que nos encontraríamos con una evidencia de cómo se organizan los distintos fenómenos moleculares que ocurren ante una gran diversidad de estímulos

Para confirmar esta hipótesis, utilizamos la misma aproximación experimental usada en el estudio del homodímero A<sub>2A</sub>R. Así, mediante BiFC visualizamos en primera instancia el heterómero D<sub>2</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R en células vivas, algo que hasta ese momento no había sido descrito. De forma importante, la distribución subcelular y los controles negativos nos corroboraron que este heterodímero se forma de manera adecuada y específica. Esta combinación de receptores ofreció un mayor rendimiento en la complementación de la YFP en el proceso BiFC y se usaron junto a A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup> en experimentos de BRET/BiFC. De manera interesante, al coexpresar las tres construcciones (i.e. A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>, mGlu<sub>5</sub>R<sup>N-YFP</sup> y D<sub>2</sub>R<sup>C-YFP</sup>) obtuvimos una señal de BRET positiva y saturable, con lo que pudimos determinar que en células vivas se produce una interacción específica entre A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R y mGlu<sub>5</sub>R. Es interesante comentar en este punto que en este trabajo también se obtuvo, por medio de experimentos de coimmunoprecipitación, indicios de la formación del oligómero en tejido nativo, y que en la actualidad en nuestro laboratorio se está intentando demostrar de forma definitiva la existencia de estas estructuras más allá de en las células en cultivo.

A modo de resumen, hasta aquí, desarrollamos una nueva herramienta de trabajo (BRET/BiFC) con la que pudimos identificar mediante la aproximación BRET/BiFC oligómeros de GPCR formados por más de dos miembros, ya sean protómeros de un mismo receptor o de subtipos diferentes. De manera interesante, la utilización de esta técnica para describir nuevos oligómeros de este tipo debería permitirnos avanzar en el estudio de los GPCR. Así, poder conocer, por ejemplo, la composición de estos oligómeros de GPCR resulta muy relevante en el estudio de novedosas aproximaciones moleculares (e.g.

## Discusión

descubrimiento de nuevos dominios de interacción, diseño de ligandos con unión a más de dos protómeros, etc.) en enfermedades en las que estos receptores puedan estar involucrados.

Con la intención de poder descubrir nuevos oligómeros de los que A<sub>2A</sub>R pudiera formar parte y entender los mecanismos por los que se forman, nos interesamos por la técnica de MYTH. Así, mediante su uso, pudimos encontrar un nuevo grupo de proteínas interaccionantes. De forma importante, aunque la versión clásica de doble híbrido ya se había usado con esta finalidad (Burgueño et ál., 2003), se utilizaron solo los 120 últimos aminoácidos, lo que resultó en una limitada capacidad para detectar interacciones. Por tanto, se realizó el cribado de una librería de ADNc de cerebro usando la forma completa del receptor, con su estructura y localización apropiadas. De esta manera, después de utilizar los controles indicados y analizar las secuencias obtenidas, generamos una lista con nuevas proteínas candidatas a interaccionar con A<sub>2A</sub>R, conteniendo tanto proteínas de membrana como citosólicas.

Siempre resulta relevante que una proteína sea positiva para el ensayo de doble híbrido MYTH. En cualquier caso, aunque los controles nos confirmen la especificidad de la interacción con nuestro GPCR-anzuelo, es necesario validarla mediante otros métodos bioquímicos. En este sentido, es interesante comentar que recientemente se ha descrito que fibroblastos que expresan una forma mutada y patológica de uno de los miembros de esta lista (Niemann-Pick disease, type C1 (NPC1)) ven mejorado su fenotipo al usar el agonista de A<sub>2A</sub>R CGS21680 (Visentin et ál., 2013).

De todas maneras, nuestro interés se enfocó en el receptor huérfano GPR37, ya que revisando la literatura se puso en evidencia la relevancia de este receptor en la enfermedad de Parkinson. Además, su localización también en el estriado y su relación con la transmisión dopaminérgica (Marazziti et ál., 2007), apuntaron aún con más fuerza a la plausible interacción con A<sub>2A</sub>R, por lo que decidimos finalmente caracterizar esta interacción, tanto física como funcionalmente. En primer lugar, experimentos de colocalización por microscopía confocal demostraron que cuando fusionamos ambos GPCR a proteínas fluorescentes y los expresamos en células, los receptores codistribuyen. Por otra parte, pudimos aislar ambos receptores en inmunoprecipitados de células cotransfectadas obtenidos con anticuerpos contra ambos GPCR. En conjunto, por tanto, confirmamos con estas técnicas que A<sub>2A</sub>R y GPR37 se encuentran próximos en los mismos dominios de membrana. De todas formas, estas aproximaciones no demuestran una verdadera interacción física, por lo que para verificar que esta proximidad es lo suficientemente alta como para poder asegurar dicha

interacción, realizamos experimentos de BRET. Así, observamos que las distintas combinaciones de aceptor-donador empleadas (i.e.  $A_{2A}R^{RLuc}/GPR37^{YFP}$  y  $GPR37^{RLuc}/A_{2A}R^{YFP}$ ) fueron capaces de generar una señal positiva de transferencia de energía y que esta señal fue saturable, asegurando su especificidad. Dado que para que existan fenómenos de BRET las proteínas implicadas deben encontrarse a una distancia menor a 10 nm, podemos afirmar que existe una elevada probabilidad de que ambos receptores se encuentren interaccionando.

Una vez confirmada la interacción física entre  $A_{2A}R$  y GPR37, procedimos a estudiar las consecuencias funcionales de dicha interacción. En primer lugar, por experimentos de biotilación de proteínas de membrana plasmática constatamos dos hechos. Por una parte, observamos un aumento tanto en la expresión total de GPR37 como en la de membrana plasmática cuando se cotransfectó con  $A_{2A}R$ , respecto a expresar el receptor solo. Y de forma similar, GPR37 también tuvo un efecto en la expresión de  $A_{2A}R$ , ya que se produjo una disminución significativa de su presencia en la membrana plasmática. Dada la tendencia de GPR37 a acumularse intracelularmente, estos cambios descritos para  $A_{2A}R$  parecen relacionarse con una posible retención mediada por el receptor huérfano.

Este primer efecto funcional sobre los receptores (i.e. las variaciones en la expresión en membrana plasmática), nos motivó a estudiar cambios en la señalización que estos producían. En concreto, nos centramos en el receptor  $A_{2A}R$  por estar mejor descritos sus mecanismos de señalización. Así, mediante experimentos de acumulación de AMPc inducidos por un agonista selectivo, CGS21680, comprobamos que en condiciones de cotransfección, la capacidad de activación del receptor se vio disminuida significativamente. Además, el antagonista de  $A_{2A}R$  SCH-58261 perdió parte de su efecto inhibitorio al coexpresar GPR37. Estas observaciones nos pueden indicar que la presencia del receptor huérfano estaría disminuyendo la afinidad tanto del agonista CGS21680 (acumulándose menos AMPc) como del antagonista SCH-58261 (requiriendo una concentración mayor de este compuesto para reducir esa acumulación). Por otra parte, la menor expresión en la membrana plasmática de  $A_{2A}R$  cuando se coexpresó GPR37 constituye un factor adicional en estos cambios funcionales. En cualquier caso, podemos afirmar que hay efectos funcionales derivados de la coexpresión de GPR37 con  $A_{2A}R$ , un hecho que apunta a un posible rol modulador recíproco de estas proteínas. Por ejemplo, en condiciones patológicas la sobreacumulación intracelular de GPR37 podría conllevar una disminución en la membrana plasmática del receptor de adenosina, generándose un desequilibrio fisiológico en la célula. Por lo tanto, intentar

## Discusión

restituir la función normal de los receptores o actuar sobre el modo de interacción entre ellos para desvincularlos podría ser una posible diana de una solución terapéutica en el futuro.

La constatación de una interacción física y funcional entre  $A_{2A}R$  y GPR37 en un modelo de cultivo celular por expresión transitoria de los receptores, nos alentó a estudiar la correspondencia de este fenómeno en un modelo animal. En concreto, estudiamos el uso de antagonistas  $A_{2A}R$  en diferentes modelos de comportamiento relacionados con el sistema dopaminérgico, comparando sus efectos sobre ratones *wild-type* (WT) y sobre una cepa *knock-out* (KO) para GPR37 de ese mismo tipo de ratón.

En primer lugar, la inducción de movimientos temblorosos de mandíbula (TJM) por el uso del colinomimético pilocarpina tuvo diferentes efectos, produciendo por una parte un significativo mayor número de temblores en el animal WT. Además, la coadministración del antagonista SCH-58261 por vía intraperitoneal solo fue capaz de reducir esos TJM en el animal WT, como ya se había descrito anteriormente (Collins et ál., 2010). Por otro lado, en el segundo ensayo de comportamiento, observamos que la actividad exploratoria de los ratones KO era mayor que la de los WT. Además, la administración del antagonista de  $A_{2A}R$  preladenant aumentó esa actividad locomotora únicamente en el animal que no expresaba GPR37. En conjunto, por tanto, a partir de los experimentos de comportamiento con ratones WT y KO para GPR37, podemos realizar diversas consideraciones. Por una parte, los animales KO respondieron de manera diferente a los WT en la situación control (i.e. la administración solo de pilocarpina en el ensayo de TJM o de vehículo en el de campo abierto) lo que nos indica que las diferencias por el fondo genético (la ausencia o no de GPR37) ya marcan un estado fisiológico basal diferente en estos ensayos: es decir, hay que considerar inicialmente un efecto GPR37-dependiente. Por otra parte, aún teniendo en cuenta este factor, existieron efectos diferenciados según el tipo de animal de los antagonistas  $A_{2A}R$ ; es decir, estos fármacos indujeron cambios únicamente en uno de los dos tipos de animal (WT o KO). De forma importante, el hecho que en el animal WT se pudieran regular los TJM inducidos por pilocarpina usando un antagonista de  $A_{2A}R$ , pero que esta regulación no sucediera en los experimentos de campo abierto, nos puede sugerir que estos eventos están controlados por vías diferentes. Así, la regulación de  $A_{2A}R$  en la generación de TJM sería directamente dependiente del heterodímero  $A_{2A}R$ -GPR37, mientras que en el caso de la actividad locomotora en campo abierto no se regularía por este oligómero, si bien la ausencia de GPR37 en el KO sí afectaría de manera indirecta. Alternativamente, cabría considerar que el perfil farmacológico de los antagonistas utilizados está siendo alterado por la presencia de

GPR37. Así, podríamos proponer que el heterodímero A<sub>2A</sub>R-GPR37 (animal WT) tendría una mayor afinidad por SCH-58261 que A<sub>2A</sub>R en ausencia de GPR37 (animal KO), lo cual podría implicar un aumento de oligómeros con otros GPCR. De manera similar, en el ratón KO se habría mejorado la afinidad por preladenant (SCH-420814), produciéndose una mejora de la actividad locomotora ya descrita para otros antagonistas de A<sub>2A</sub>R (El Yacoubi et ál., 2000). De esta forma, se describió un aumento de la locomoción inducida por ZM-241385, incluso contrarrestando los efectos depresores del movimiento del agonista selectivo CGS 21680 (El Yacoubi et ál., 2000). Finalmente, cabe comentar que, dado que el perfil farmacológico de agonistas y antagonistas de A<sub>2A</sub>R se ha asociado a la preferencia por unirse a oligómeros situados presinápticamente o postsinápticamente (Orru et ál., 2011), sería especialmente interesante identificar en qué tipo neuronal y región sináptica del estriado se encuentra el heterodímero A<sub>2A</sub>R-GPR37 y determinar si, efectivamente, la ausencia del receptor huérfano se relaciona con variaciones en los perfiles farmacológicos de los antagonistas utilizados. Lamentablemente, la escasa información sobre GPR37 impide el avance en el conocimiento de estos mecanismos de regulación.

En base a esta última reflexión, es decir, la poca información existente acerca de GPR37, y por supuesto la nueva interacción descrita con el A<sub>2A</sub>R, los últimos experimentos realizados en esta Tesis doctoral tuvieron como objetivo determinar cómo se produce la interacción entre los receptores A<sub>2A</sub>R y GPR37. Por lo tanto, decidimos intentar elucidar algunas características moleculares del receptor GPR37. A este respecto, en primer lugar nos centramos en estudiar el dominio C-terminal de GPR37, en concreto en una región rica en cisteínas (entre los residuos 563 y 568).

Así, realizamos diversas mutaciones en esa secuencia, eliminando partes sucesivas de la cola C-terminal del receptor, conservando o no ese dominio de poli-cisteínas. Mediante ensayos de inmunocitoquímica y biotinylación, observamos que, mientras que la forma nativa de GPR37 presentaba una notable acumulación intracelular (algo previamente descrito, Murakami et ál., 2004), la ausencia del dominio rico en cisteínas (en los mutantes GPR37<sup>Δ563-568</sup> y GPR37<sup>Δ563</sup>) promovió una mayor presencia del receptor en membrana plasmática. Estos resultados apuntan a un papel crucial de esta región en el tráfico del receptor, aunque difieren de otros publicados donde la eliminación de esta cola intracelular evita la expresión en la superficie celular (Dunham et ál., 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que ambos trabajos tuvieron aproximaciones metodológicas distintas, tanto en el número de aminoácidos eliminados como en la técnica de determinación del receptor en membrana plasmática,

## Discusión

principalmente. En cualquier caso, decidimos a continuación evaluar los cambios provocados por este dominio rico en cisteínas en la funcionalidad del receptor. De manera interesante, la incubación de células transfectadas con GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup> con el neuropéptido HA (un agonista al menos parcial del receptor) produjo un efecto similar de clusterización del receptor en la membrana, mientras que la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la inhibición de la acumulación de AMPc, se vieron aumentadas en la forma mutada de GPR37, en concordancia con la mayor presencia en membrana de GPR37<sup>Δ563-568</sup>.

Otra consecuencia de la mejora en el tráfico de GPR37 es una menor la retención de este receptor en compartimentos intracelulares, fenómeno que se ha asociado con una menor viabilidad celular (Takahashi e Imai, 2003). Por lo tanto, investigamos si el estrés de retículo endoplasmático y la citotoxicidad asociados a la expresión del receptor estaban determinados al menos parcialmente por el dominio rico en cisteínas.

Así, evaluamos la maquinaria de respuesta a proteínas no plegadas (UPR) en función de la expresión del receptor, determinando la expresión de dos miembros de esta vía situados en diferentes puntos de la cascada de respuestas, GRP78 y ATF4. De la misma manera, estudiamos los efectos sobre la viabilidad celular de cultivos que expresan GPR37 o GPR37<sup>Δ563-568</sup>, midiendo tanto la muerte celular asociada a la expresión del receptor como la activación específica de caspasa-3.

De forma interesante, determinamos mediante estos experimentos que la forma nativa de GPR37 activa de manera clara la maquinaria de UPR, mientras que la ausencia del dominio rico en cisteínas de GPR37<sup>Δ563-568</sup> reduciría de manera significativa la inducción de estos mecanismos. De manera similar, tanto la proporción de células muertas como de cantidad de caspasa-3 activa fue menor en células transfectadas con GPR37<sup>Δ563-568</sup> que con la forma nativa del receptor huérfano.

En resumen, hemos descrito el papel crucial de una secuencia discreta de la cola C-terminal de GPR37 que participaría en el control del tráfico hacia la membrana plasmática y, consecuentemente, con la transducción de señal dependiente de ese receptor. Esta participación, por cierto, podría deberse a modificaciones postraduccionales sufridas en este dominio rico en cisteínas (Greaves, 2007), por lo que sería interesante realizar mutaciones puntuales en la secuencia peptídica para poder determinar si son residuos específicos los responsables de estos cambios. Además, la mejora en la distribución en superficie celular del receptor lleva asociada una disminución en los mecanismos de citotoxicidad relacionados con

la formación de agregados intracelulares por UPR. Un posible mecanismo para esta agregación se ha descrito mediante la S-nitrosilación de residuos de cisteína, que puede llevar al mal plegamiento de las proteínas (Muchowski y Wacker, 2005). Por lo tanto, podemos postular que la región rica en cisteínas de la cola C-terminal de GPR37 constituye un sensor (del plegamiento del receptor, del estado redox celular), cuya ausencia o bloqueo facilitan el tráfico y suprime su acumulación tóxica. Uno de esos posibles bloqueos de este dominio se podría ocasionar mediante la interacción con otros GPCR, dado que la heteromerización suele modular el tráfico de los receptores. Así, sería interesante analizar en el futuro si existe una relación entre el dominio rico en cisteínas de GPR37 y la heterodimerización con  $A_{2A}R$ . Además, el hecho que GPR37 también aparezca por MYTH como candidato a interactuar con el receptor de dopamina  $D_2$ , abre nuevas posibilidades de estudio de un posible complejo oligomérico  $A_{2A}R/D_2R/GPR37$ .



## Discusión

## **CONCLUSIONES**



- Mediante la aplicación de una nueva metodología, consistente en la combinación de las técnicas de transferencia de energía de resonancia por bioluminiscencia (BRET) y de complementación fluorescente bimolecular (BiFC), hemos podido detectar en células vivas la formación de oligómeros del receptor  $A_{2A}$  de adenosina con más de dos miembros.
- En el estudio de las interacciones entre  $A_{2A}R$  con el receptor  $D_2$  de dopamina ( $D_2R$ ) y el receptor metabotrópico 5 de glutamato ( $mGlu_5R$ ), hemos podido describir la formación de heterodímeros  $D_2R/mGlu_5R$  mediante BiFC y la existencia en células vivas de el oligómero  $A_{2A}R/D_2R/mGlu_5R$  por la aplicación del método BRET/BiFC.
- Se han encontrado diez nuevas proteínas candidatas a interactuar con  $A_{2A}R$  mediante la aplicación de una versión modificada de la técnica de doble híbrido para proteínas de membrana (MYTH). De entre los resultados encontrados, correspondientes tanto a proteínas de membrana como citosólicas, ha destacado la aparición de un receptor acoplado a proteína G huérfano, GPR37.
- La validación de la interacción entre  $A_{2A}R$  y GPR37 se ha realizado mediante experimentos en cultivos celulares y en modelos de comportamiento animal. Se ha demostrado la interacción física y se han determinado sus consecuencias funcionales, que incluyen los cambios en la expresión en superficie celular y la modificación de la efectividad de agonistas y antagonistas de  $A_{2A}R$  mediada por la presencia de GPR37.
- En el estudio estructural de GPR37, se ha demostrado la importancia de una región rica en cisteínas (residuos 563 a 568) en el tráfico del receptor hacia la membrana plasmática, la inducción de estrés de retículo plasmático y la activación de caspasa-3 y vías apoptóticas mediadas por ese estrés.

## Conclusiones

## **BIBLIOGRAFÍA**



Abbracchio, M. P., R. Brambilla, S. Ceruti, H. O. Kim, D. K. von Lubitz, K. A. Jacobson and F. Cattabeni (1995). "G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain." Mol Pharmacol **48**(6): 1038-1045.

Baneres, J. L. and J. Parelo (2003). "Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein." J Mol Biol **329**(4): 815-829.

Bara-Jimenez, W., A. Sherzai, T. Dimitrova, A. Favit, F. Bibbiani, M. Gillespie, M. J. Morris, M. M. Mouradian and T. N. Chase (2003). "Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease." Neurology **61**(3): 293-296.

Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**(6305): 117-127.

Breit, A., M. Lagace and M. Bouvier (2004). "Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties." J Biol Chem **279**(27): 28756-28765.

Bridson, S. J., J. Gandia, O. B. Amaral, S. Ferre, C. Lluís, R. Franco, S. J. Hill and F. Ciruela (2008). "Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers." Biochim Biophys Acta **1783**(12): 2262-2268.

Burgoyne, R. D. (2007). "Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling." Nat Rev Neurosci **8**(3): 182-193.

Burgueno, J., D. J. Blake, M. A. Benson, C. L. Tinsley, C. T. Esapa, E. I. Canela, P. Penela, J. Mallol, F. Mayor, Jr., C. Lluís, R. Franco and F. Ciruela (2003). "The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin." J Biol Chem **278**(39): 37545-37552.

Cabello, N., J. Gandia, D. C. Bertarelli, M. Watanabe, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre, R. Lujan and F. Ciruela (2009). "Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a



## Bibliografia

receptors form higher-order oligomers in living cells." J Neurochem **109**(5): 1497-1507.

Cabello, N., R. Remelli, L. Canela, A. Soriguera, J. Mallol, E. I. Canela, M. J. Robbins, C. Lluís, R. Franco, R. A. McIlhinney and F. Ciruela (2007). "Actin-binding protein alpha-actinin-1 interacts with the metabotropic glutamate receptor type 5b and modulates the cell surface expression and function of the receptor." J Biol Chem **282**(16): 12143-12153.

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

Canals, M., J. Burgueno, D. Marcellino, N. Cabello, E. I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, S. Ferre, M. Bouvier, K. Fuxe, F. Ciruela, C. Lluís and R. Franco (2004). "Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." J Neurochem **88**(3): 726-734.

Canals, M., D. Marcellino, F. Fanelli, F. Ciruela, P. de Benedetti, S. R. Goldberg, K. Neve, K. Fuxe, L. F. Agnati, A. S. Woods, S. Ferre, C. Lluís, M. Bouvier and R. Franco (2003). "Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer." J Biol Chem **278**(47): 46741-46749.

Canela, L., R. Lujan, C. Lluís, J. Burgueno, J. Mallol, E. I. Canela, R. Franco and F. Ciruela (2007). "The neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A<sub>2A</sub> receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor." Mol Cell Neurosci **36**(1): 1-12.

Carrillo, J. J., J. Pediani and G. Milligan (2003). "Dimers of class A G protein-coupled receptors function via agonist-mediated trans-activation of associated G proteins." J Biol Chem **278**(43): 42578-42587.

Chevallier, M. R. (1982). "Cloning and transcriptional control of a eucaryotic permease gene." Mol Cell Biol **2**(8): 977-984.

Chini, B. and M. Parenti (2009). "G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats." J Mol Endocrinol **42**(5): 371-379.

Ciruela, F., C. Albergaria, A. Soriano, L. Cuffi, L. Carbonell, S. Sanchez, J. Gandia and V. Fernandez-Duenas (2010). "Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling." Biochim Biophys Acta **1798**(1): 9-20.

Ciruela, F., J. Burgueno, V. Casado, M. Canals, D. Marcellino, S. R. Goldberg, M. Bader, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre and A. S. Woods (2004). "Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors." Anal Chem **76**(18): 5354-5363.

Ciruela, F., V. Casado, R. J. Rodrigues, R. Lujan, J. Burgueno, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S. R. Goldberg, J. Mallol, A. Cortes, E. I. Canela, J. F. Lopez-Gimenez, G. Milligan, C. Lluís, R. A. Cunha, S. Ferre and R. Franco (2006). "Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers." J Neurosci **26**(7): 2080-2087.

Collins, L. E., D. J. Galtieri, L. T. Brennum, T. N. Sager, J. Hockemeyer, C. E. Muller, J. R. Hinman, J. J. Chrobak and J. D. Salamone (2010). "Oral tremor induced by the muscarinic agonist pilocarpine is suppressed by the adenosine A2A antagonists MSX-3 and SCH58261, but not the adenosine A1 antagonist DPCPX." Pharmacol Biochem Behav **94**(4): 561-569.

Conquet, F., Z. I. Bashir, C. H. Davies, H. Daniel, F. Ferraguti, F. Bordini, K. Franz-Bacon, A. Reggiani, V. Matarese, F. Conde and et al. (1994). "Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1." Nature **372**(6503): 237-243.

Daaka, Y., L. M. Luttrell, S. Ahn, G. J. Della Rocca, S. S. Ferguson, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1998). "Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(2): 685-688.

Damian, M., A. Martin, D. Mesnier, J. P. Pin and J. L. Baneres (2006). "Asymmetric

## Bibliografia

conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins." EMBO J **25**(24): 5693-5702.

Dev, K. K., H. van der Putten, B. Sommer and G. Rovelli (2003). "Part I: parkin-associated proteins and Parkinson's disease." Neuropharmacology **45**(1): 1-13.

Diaz-Cabiale, Z., M. Vivo, A. Del Arco, W. T. O'Connor, M. K. Harte, C. E. Muller, E. Martinez, P. Popoli, K. Fuxe and S. Ferre (2002). "Metabotropic glutamate mGlu5 receptor-mediated modulation of the ventral striopallidal GABA pathway in rats. Interactions with adenosine A(2A) and dopamine D(2) receptors." Neurosci Lett **324**(2): 154-158.

Donohue, P. J., H. Shapira, S. A. Mantey, L. L. Hampton, R. T. Jensen and J. F. Battey (1998). "A human gene encodes a putative G protein-coupled receptor highly expressed in the central nervous system." Brain Res Mol Brain Res **54**(1): 152-160.

Dunah, A. W., M. Wyszynski, D. M. Martin, M. Sheng and D. G. Standaert (2000). "alpha-actinin-2 in rat striatum: localization and interaction with NMDA glutamate receptor subunits." Brain Res Mol Brain Res **79**(1-2): 77-87.

Dunham, J. H., R. C. Meyer, E. L. Garcia and R. A. Hall (2009). "GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions." Biochemistry **48**(43): 10286-10297.

El Yacoubi, M., C. Ledent, M. Parmentier, J. Costentin and J. Vaugeois (2000). "SCH 58261 and ZM 241385 differentially prevent the motor effects of CGS 21680 in mice: evidence for a functional 'atypical' adenosine A(2A) receptor." Eur J Pharmacol **401**(1): 63-77.

Ellis, C. (2004). "The state of GPCR research in 2004." Nature Reviews Drug Discovery **3**(7): 577-626.

Fan, F. and K. V. Wood (2007). "Bioluminescent assays for high-throughput screening." Assay Drug Dev Technol **5**(1): 127-136.

Feoktistov, I. and I. Biaggioni (1995). "Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8

secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma." J Clin Invest **96**(4): 1979-1986.

Ferre, S., L. F. Agnati, F. Ciruela, C. Lluís, A. S. Woods, K. Fuxe and R. Franco (2007). "Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module." Brain Res Rev **55**(1): 55-67.

Ferre, S., F. Ciruela, C. Quiroz, R. Lujan, P. Popoli, R. A. Cunha, L. F. Agnati, K. Fuxe, A. S. Woods, C. Lluís and R. Franco (2007). "Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function." ScientificWorldJournal **7**: 74-85.

Ferre, S., F. Ciruela, A. S. Woods, C. Lluís and R. Franco (2007). "Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system." Trends Neurosci **30**(9): 440-446.

Ferre, S., M. Karcz-Kubicha, B. T. Hope, P. Popoli, J. Burgueno, M. A. Gutierrez, V. Casado, K. Fuxe, S. R. Goldberg, C. Lluís, R. Franco and F. Ciruela (2002). "Synergistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> and glutamate mGlu<sub>5</sub> receptors: implications for striatal neuronal function." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11940-11945.

Ferre, S., G. von Euler, B. Johansson, B. B. Fredholm and K. Fuxe (1991). "Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7238-7241.

Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik **437**(1-2): 55-75.

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

Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff and M. Williams (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev **46**(2): 143-156.

## Bibliografia

Fredholm, B. B., G. Arslan, L. Halldner, B. Kull, G. Schulte and W. Wasserman (2000). "Structure and function of adenosine receptors and their genes." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 364-374.

Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." Mol Pharmacol **63**(6): 1256-1272.

Fuxe, K., L. F. Agnati, K. Jacobsen, J. Hillion, M. Canals, M. Torvinen, B. Tinner-Staines, W. Staines, D. Rosin, A. Terasmaa, P. Popoli, G. Leo, V. Vergoni, C. Lluís, F. Ciruela, R. Franco and S. Ferre (2003). "Receptor heteromerization in adenosine A2A receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease." Neurology **61**(11 Suppl 6): S19-23.

Fuxe, K., S. Ferre, S. Genedani, R. Franco and L. F. Agnati (2007). "Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function." Physiol Behav **92**(1-2): 210-217.

Fuxe, K. and U. Ungerstedt (1974). "Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists." Med Biol **52**(1): 48-54.

Gandia, J., C. Lluís, S. Ferre, R. Franco and F. Ciruela (2008). "Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization." Bioessays **30**(1): 82-89.

George, S. R., B. F. O'Dowd and S. P. Lee (2002). "G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **1**(10): 808-820.

Gerwins, P. and B. B. Fredholm (1992). "Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7330-7334.

Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.

Gomes, I., B. A. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy and L. A. Devi (2000). "Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy." J Neurosci **20**(22): RC110.

Goudet, C., J. Kniazeff, V. Hlavackova, F. Malhaire, D. Maurel, F. Acher, J. Blahos, L. Prezeau and J. P. Pin (2005). "Asymmetric functioning of dimeric metabotropic glutamate receptors disclosed by positive allosteric modulators." J Biol Chem **280**(26): 24380-24385.

Greaves, J. and L. H. Chamberlain (2007). "Palmitoylation-dependent protein sorting." J Cell Biol **176**(3): 249-254.

Gudermann, T., T. Schoneberg and G. Schultz (1997). "Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors." Annu Rev Neurosci **20**: 399-427.

Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem **273**(2): 669-672.

Harding, H. P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." Mol Cell **6**(5): 1099-1108.

Hauser, R. A., J. P. Hubble, D. D. Truong and U. S. S. G. Istradefylline (2003). "Randomized trial of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline in advanced PD." Neurology **61**(3): 297-303.

Hettinger, B. D., A. Lee, J. Linden and D. L. Rosin (2001). "Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum." J Comp Neurol **431**(3): 331-346.

Hink, M. A., J. W. Borst and A. J. Visser (2003). "Fluorescence correlation spectroscopy of GFP fusion proteins in living plant cells." Methods Enzymol **361**: 93-112.

## Bibliografia

Hlavackova, V., C. Goudet, J. Kniazeff, A. Zikova, D. Maurel, C. Vol, J. Trojanova, L. Prezeau, J. P. Pin and J. Blahos (2005). "Evidence for a single heptahelical domain being turned on upon activation of a dimeric GPCR." EMBO J **24**(3): 499-509.

Hodgson, R. A., R. Bertorelli, G. B. Varty, J. E. Lachowicz, A. Forlani, S. Fredduzzi, M. E. Cohen-Williams, G. A. Higgins, F. Impagnatiello, E. Nicolussi, L. E. Parra, C. Foster, Y. Zhai, B. R. Neustadt, A. W. Stamford, E. M. Parker, A. Reggiani and J. C. Hunter (2009). "Characterization of the potent and highly selective A2A receptor antagonists preladenant and SCH 412348 [7-[2-[4-2,4-difluorophenyl]-1-piperazinyl]ethyl]-2-(2-furanyl)-7H-pyrazolo[4,3-e ][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine] in rodent models of movement disorders and depression." J Pharmacol Exp Ther **330**(1): 294-303.

Imai, Y., M. Soda, H. Inoue, N. Hattori, Y. Mizuno and R. Takahashi (2001). "An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin." Cell **105**(7): 891-902.

Ishiwari, K., S. Mingote, M. Correa, J. T. Trevitt, B. B. Carlson and J. D. Salamone (2004). "The GABA uptake inhibitor beta-alanine reduces pilocarpine-induced tremor and increases extracellular GABA in substantia nigra pars reticulata as measured by microdialysis." J Neurosci Methods **140**(1-2): 39-46.

Jacoby, E., R. Bouhelal, M. Gerspacher and K. Seuwen (2006). "The 7 TM G-protein-coupled receptor target family." ChemMedChem **1**(8): 761-782.

Johnsson, N. and A. Varshavsky (1994). "Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10340-10344.

Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek and C. Gerald (1998). "GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2." Nature **396**(6712): 674-679.

Jordan, B. A. and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization

modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.

Kachroo, A., L. R. Orlando, D. K. Grandy, J. F. Chen, A. B. Young and M. A. Schwarzschild (2005). "Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A2A receptors in normal and parkinsonian mice." J Neurosci **25**(45): 10414-10419.

Kamiya, T., O. Saitoh, K. Yoshioka and H. Nakata (2003). "Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells." Biochem Biophys Res Commun **306**(2): 544-549.

Kanda, T., M. J. Jackson, L. A. Smith, R. K. Pearce, J. Nakamura, H. Kase, Y. Kuwana and P. Jenner (2000). "Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys." Exp Neurol **162**(2): 321-327.

Kanda, T., T. Tashiro, Y. Kuwana and P. Jenner (1998). "Adenosine A2A receptors modify motor function in MPTP-treated common marmosets." Neuroreport **9**(12): 2857-2860.

Karcz-Kubicha, M., S. Ferre, O. Diaz-Ruiz, C. Quiroz-Molina, S. R. Goldberg, B. T. Hope and M. Morales (2006). "Stimulation of adenosine receptors selectively activates gene expression in striatal enkephalinergic neurons." Neuropsychopharmacology **31**(10): 2173-2179.

Kaupmann, K., B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin and B. Bettler (1998). "GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes." Nature **396**(6712): 683-687.

Kelleher, D. J. and R. Gilmore (1994). "The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides." J Biol Chem **269**(17): 12908-12917.

Kennedy, M. B. (2000). "Signal-processing machines at the postsynaptic density." Science **290**(5492): 750-754.



## Bibliografia

Kerppola, T. K. (2006). "Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells." Nat Protoc **1**(3): 1278-1286.

Kitao, Y., Y. Imai, K. Ozawa, A. Kataoka, T. Ikeda, M. Soda, K. Nakimawa, H. Kiyama, D. M. Stern, O. Hori, K. Wakamatsu, S. Ito, S. Itohara, R. Takahashi and S. Ogawa (2007). "Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation." Hum Mol Genet **16**(1): 50-60.

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

Kull, B., P. Svenningsson and B. B. Fredholm (2000). "Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum." Mol Pharmacol **58**(4): 771-777.

Lee, A. S. (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." Methods **35**(4): 373-381.

Lee, S. P., C. H. So, A. J. Rashid, G. Varghese, R. Cheng, A. J. Lanca, B. F. O'Dowd and S. R. George (2004). "Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal." J Biol Chem **279**(34): 35671-35678.

Lefkowitz, R. J. (1998). "G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization." J Biol Chem **273**(30): 18677-18680.

Leng, N., G. Gu, R. B. Simerly and E. R. Spindel (1999). "Molecular cloning and characterization of two putative G protein-coupled receptors which are highly expressed in the central nervous system." Brain Res Mol Brain Res **69**(1): 73-83.

Londos, C., D. M. Cooper and J. Wolff (1980). "Subclasses of external adenosine receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2551-2554.

Lu, Y. M., Z. Jia, C. Janus, J. T. Henderson, R. Gerlai, J. M. Wojtowicz and J. C. Roder

(1997). "Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP." J Neurosci **17**(13): 5196-5205.

MacDonald, R. L., J. H. Skerritt and M. A. Werz (1986). "Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture." J Physiol **370**: 75-90.

Marazziti, D., A. Gallo, E. Golini, R. Matteoni and G. P. Tocchini-Valentini (1998). "Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis." Genomics **53**(3): 315-324.

Marazziti, D., E. Golini, A. Gallo, M. S. Lombardi, R. Matteoni and G. P. Tocchini-Valentini (1997). "Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G-protein-coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library." Genomics **45**(1): 68-77.

Marazziti, D., S. Mandillo, C. Di Pietro, E. Golini, R. Matteoni and G. P. Tocchini-Valentini (2007). "GPR37 associates with the dopamine transporter to modulate dopamine uptake and behavioral responses to dopaminergic drugs." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9846-9851.

Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." Neuron **27**(1): 97-106.

Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." Trends Pharmacol Sci **22**(7): 368-376.

Maruyama, K. and S. Ebashi (1965). "Alpha-actinin, a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin." J Biochem **58**(1): 13-19.

Mercuri, N. B., A. Saiardi, A. Bonci, R. Picetti, P. Calabresi, G. Bernardi and E. Borrelli (1997). "Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice." Neuroscience **79**(2): 323-327.

## Bibliografia

Metaye, T., H. Gibelin, R. Perdrisot and J. L. Kraimps (2005). "Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases." Cell Signal **17**(8): 917-928.

Meyer, R. C., M. M. Giddens, S. A. Schaefer and R. A. Hall (2013). "GPR37 and GPR37L1 are receptors for the neuroprotective and glioprotective factors prosaptide and prosaposin." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(23): 9529-9534.

Milligan, G. and M. Bouvier (2005). "Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors." FEBS J **272**(12): 2914-2925.

Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.

Moreau, J. L. and G. Huber (1999). "Central adenosine A(2A) receptors: an overview." Brain Res Brain Res Rev **31**(1): 65-82.

Muchowski, P. J. and J. L. Wacker (2005). "Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones." Nat Rev Neurosci **6**(1): 11-22.

Munshi, R., I. H. Pang, P. C. Sternweis and J. Linden (1991). "A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go." J Biol Chem **266**(33): 22285-22289.

Murakami, T., M. Shoji, Y. Imai, H. Inoue, T. Kawarabayashi, E. Matsubara, Y. Harigaya, A. Sasaki, R. Takahashi and K. Abe (2004). "Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson's disease." Ann Neurol **55**(3): 439-442.

Nishi, A., J. A. Bibb, G. L. Snyder, H. Higashi, A. C. Nairn and P. Greengard (2000). "Amplification of dopaminergic signaling by a positive feedback loop." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12840-12845.

Orru, M., J. Bakesova, M. Brugarolas, C. Quiroz, V. Beaumont, S. R. Goldberg, C. Lluís, A. Cortes, R. Franco, V. Casado, E. I. Canela and S. Ferre (2011). "Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists." PLoS One **6**(1): e16088.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-745.

Palmer, T. M., T. W. Gettys, K. A. Jacobson and G. L. Stiles (1994). "Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes." Mol Pharmacol **45**(6): 1082-1094.

Peterfreund, R. A., M. MacCollin, J. Gusella and J. S. Fink (1996). "Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene." J Neurochem **66**(1): 362-368.

Pfleger, K. D. and K. A. Eidne (2006). "Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Nat Methods **3**(3): 165-174.

Pierce, K. D., T. J. Furlong, L. A. Selbie and J. Shine (1992). "Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain." Biochem Biophys Res Commun **187**(1): 86-93.

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

Pisani, A., P. Gubellini, P. Bonsi, F. Conquet, B. Picconi, D. Centonze, G. Bernardi and P. Calabresi (2001). "Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of N-methyl-D-aspartate responses in medium spiny striatal neurons." Neuroscience **106**(3): 579-587.

Popoli, P., A. Pezzola, M. Torvinen, R. Reggio, A. Pintor, L. Scarchilli, K. Fuxe and S. Ferre (2001). "The selective mGlu(5) receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D(2) receptors in the rat striatum: interactions with adenosine A(2a) receptors." Neuropsychopharmacology **25**(4): 505-513.

Rashid, A. J., C. H. So, M. M. Kong, T. Furtak, M. El-Ghundi, R. Cheng, B. F. O'Dowd and S. R. George (2007). "D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology

## Bibliografia

are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 654-659.

Rebola, N., P. M. Canas, C. R. Oliveira and R. A. Cunha (2005). "Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat." Neuroscience **132**(4): 893-903.

Rezgaoui, M., U. Susens, A. Ignatov, M. Gelderblom, G. Glassmeier, I. Franke, J. Urny, Y. Imai, R. Takahashi and H. C. Schaller (2006). "The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37." J Cell Sci **119**(Pt 3): 542-549.

Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao and A. de Mendonca (2002). "Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications." Prog Neurobiol **68**(6): 377-392.

Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao and A. de Mendonca (2003). "Participation of adenosine receptors in neuroprotection." Drug News Perspect **16**(2): 80-86.

Rivkees, S. A. (1994). "Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis." Endocrinology **135**(6): 2307-2313.

Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel and Y. C. Patel (2000). "Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers." J Biol Chem **275**(11): 7862-7869.

Rodrigues, R. J., T. M. Alfaro, N. Rebola, C. R. Oliveira and R. A. Cunha (2005). "Co-localization and functional interaction between adenosine A(2A) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum." J Neurochem **92**(3): 433-441.

Rosin, D. L., B. D. Hettinger, A. Lee and J. Linden (2003). "Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function." Neurology **61**(11 Suppl 6): S12-18.

Rosin, D. L., A. Robeva, R. L. Woodard, P. G. Guyenet and J. Linden (1998).

"Immunohistochemical localization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors in the rat central nervous system." J Comp Neurol **401**(2): 163-186.

Rycroft, B. K. and A. J. Gibb (2004). "Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells." J Physiol **557**(Pt 3): 795-808.

Salamone, J. D., A. J. Betz, K. Ishiwari, J. Felsted, L. Madson, B. Mirante, K. Clark, L. Font, S. Korbey, T. N. Sager, J. Hockemeyer and C. E. Muller (2008). "Tremorolytic effects of adenosine A<sub>2A</sub> antagonists: implications for parkinsonism." Front Biosci **13**: 3594-3605.

Salamone, J. D., A. J. Mayorga, J. T. Trevitt, M. S. Cousins, A. Conlan and A. Nawab (1998). "Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor." Prog Neurobiol **56**(6): 591-611.

Schulte, G. and B. B. Fredholm (2003). "Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases." Cell Signal **15**(9): 813-827.

Schwarzschild, M. A., J. F. Chen and A. Ascherio (2002). "Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD." Neurology **58**(8): 1154-1160.

Seidel, M. G., M. Klinger, M. Freissmuth and C. Holler (1999). "Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway." J Biol Chem **274**(36): 25833-25841.

Sheng, M. and C. C. Hoogenraad (2007). "The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View." Annual Review of Biochemistry **76**(1): 823-847.

Shimura, H., N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka and T. Suzuki (2000). "Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase." Nat Genet **25**(3): 302-305.

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

**196 ( Pt 4): 555-576.**

Snider, J., S. Kittanakom, D. Damjanovic, J. Curak, V. Wong and I. Stagljjar (2010). "Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast." Nat Protoc **5**(7): 1281-1293.

Sriram, S. R., X. Li, H. S. Ko, K. K. Chung, E. Wong, K. L. Lim, V. L. Dawson and T. M. Dawson (2005). "Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin." Hum Mol Genet **14**(17): 2571-2586.

Stehle, J. H., S. A. Rivkees, J. J. Lee, D. R. Weaver, J. D. Deeds and S. M. Reppert (1992). "Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype." Mol Endocrinol **6**(3): 384-393.

Stryer, L. and R. P. Haugland (1967). "Energy transfer: a spectroscopic ruler." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 719-726.

Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman and A. Samali (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-885.

Takahashi, R. and Y. Imai (2003). "Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease." J Neurol **250 Suppl 3**: III25-29.

Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." EMBO Rep **5**(1): 30-34.

Torvinen, M., C. Torri, A. Tombesi, D. Marcellino, S. Watson, C. Lluís, R. Franco, K. Fuxe and L. F. Agnati (2005). "Trafficking of adenosine A2A and dopamine D2 receptors." J Mol Neurosci **25**(2): 191-200.

Trevitt, J., A. Atherton, J. Aberman and J. D. Salamone (1998). "Effects of subchronic administration of clozapine, thioridazine and haloperidol on tests related to extrapyramidal motor function in the rat." Psychopharmacology (Berl) **137**(1): 61-66.

Trevitt, J., K. Kawa, A. Jalali and C. Larsen (2009). "Differential effects of adenosine antagonists in two models of parkinsonian tremor." Pharmacol Biochem Behav **94**(1): 24-29.

Trussell, L. O. and M. B. Jackson (1985). "Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(14): 4857-4861.

Ulrich, C. D., 2nd, M. Holtmann and L. J. Miller (1998). "Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors." Gastroenterology **114**(2): 382-397.

Valdenaire, O., T. Giller, V. Breu, A. Ardati, A. Schweizer and J. G. Richards (1998). "A new family of orphan G protein-coupled receptors predominantly expressed in the brain." FEBS Lett **424**(3): 193-196.

Visentin, S., C. De Nuccio, A. Bernardo, R. Peponi, A. Ferrante, L. Minghetti and P. Popoli (2013). "The Stimulation of Adenosine A2A Receptors Ameliorates the Pathological Phenotype of Fibroblasts from Niemann-Pick Type C Patients." J Neurosci **33**(39): 15388-15393.

White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord and F. H. Marshall (1998). "Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor." Nature **396**(6712): 679-682.

Wirkner, K., H. Assmann, L. Koles, Z. Gerevich, H. Franke, W. Norenberg, R. Boehm and P. Illes (2000). "Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons." Br J Pharmacol **130**(2): 259-269.

Wirkner, K., J. Schweigel, Z. Gerevich, H. Franke, C. Allgaier, E. L. Barsoumian, H. Draheim and P. Illes (2004). "Adenine nucleotides inhibit recombinant N-type calcium channels via G protein-coupled mechanisms in HEK 293 cells; involvement of the P2Y13 receptor-type." Br J Pharmacol **141**(1): 141-151.

Wu, P. and L. Brand (1994). "Resonance energy transfer: methods and applications." Anal



Bibliografia

Biochem **218**(1): 1-13.

Yesilaltay, A. and D. D. Jenness (2000). "Homo-oligomeric complexes of the yeast alpha-factor pheromone receptor are functional units of endocytosis." Mol Biol Cell **11**(9): 2873-2884.

Zeng, Z., K. Su, H. Kyaw and Y. Li (1997). "A novel endothelin receptor type-B-like gene enriched in the brain." Biochem Biophys Res Commun **233**(2): 559-567.

Zhang, Y., J. Gao, K. K. Chung, H. Huang, V. L. Dawson and T. M. Dawson (2000). "Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13354-13359.

Zhou, Q. Y., C. Li, M. E. Olah, R. A. Johnson, G. L. Stiles and O. Civelli (1992). "Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7432-7436.

## **ANEXO I**



# Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET–BiFC technique

Jorge Gandia<sup>a,1</sup>, Jorge Galino<sup>b,1</sup>, Olavo B. Amaral<sup>a</sup>, Aroa Soriano<sup>c</sup>, Carme Lluís<sup>c</sup>, Rafael Franco<sup>c</sup>, Francisco Ciruela<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina (Campus de Bellvitge), IDIBELL, Universitat de Barcelona, Pavelló de Govern, Av. Fexia Llarga, s/n, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Centre de Genètica Mèdica i Molecular, IDIBELL, Hospital Duran i Reynals, Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain*

<sup>c</sup> *IDIBAPS, CIBERNED and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain*

Received 28 April 2008; revised 1 July 2008; accepted 11 July 2008

Available online 7 August 2008

Edited by Michael R. Bubb

**Abstract** Despite some caveats, G protein-coupled receptor oligomerization is a phenomenon that is becoming largely accepted. Within these oligomers, however, stoichiometry remains to be elucidated. Here, by using bimolecular fluorescence complementation, we visualized adenosine A<sub>2A</sub> receptor homodimers in living cells, showing no apparent difference in the subcellular distribution when compared to the YFP-labelled adenosine A<sub>2A</sub> receptor protomer. Interestingly, the combination of bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence resonance energy transfer techniques allowed us to detect the occurrence of adenosine A<sub>2A</sub> receptors oligomers containing more than two protomers. These results provide new insights into the molecular composition of G protein-coupled receptor oligomers.

*Structured summary:*

MINT-6700472:

*A2A* (uniprotkb:P29274), *A2A* (uniprotkb:P29274) and *A2A* (uniprotkb:P29274) physically interact (MI:0218) by bioluminescence resonance energy transfer (MI:0012)

MINT-6699330:

*A2A* (uniprotkb:P29274) and *A2A* (uniprotkb:P29274) physically interact (MI:0218) by bimolecular fluorescence complementation (MI:0809)

MINT-6699346:

*A2A* (uniprotkb:P29274) and *A2A* (uniprotkb:P29274) physically interact (MI:0218) by bioluminescence resonance energy transfer (MI:0012)

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** G protein-coupled receptors; Adenosine receptors; Receptor oligomerization

## 1. Introduction

Adenosine, a well known endogenous modulator in the central nervous system, as well as in the immune and circulatory systems, exerts its actions through G protein-coupled adenosine receptors (GPCRs). Of the four known adenosine recep-

tors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>), the A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R) is one of the major mediators of the central effects of adenosine [1]. A<sub>2A</sub>Rs are mostly coupled to G<sub>s</sub> proteins [2], thus being mainly linked to adenylyl cyclase activation. Despite being prototypic G<sub>s</sub> protein-coupled receptors, A<sub>2A</sub>Rs can also signal through other means such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, via a pathway that is independent of heterotrimeric G proteins [3,4].

During the last decade, the fact that GPCRs form homo- and heterodimers, or even higher-order oligomers, has been extensively accepted, thus opening new avenues for drug discovery [5]. The existence of these receptor–receptor interactions has been demonstrated by several approaches including both immobilized protein–protein interaction assays and non-invasive light resonance energy transfer-based methods [6]. By means of these approaches, we have demonstrated that the A<sub>2A</sub>R form homodimers and that homodimers and not monomers are the functional species at the cell surface of living cells [7]. Furthermore, A<sub>2A</sub>R has also been shown to heterodimerize with other GPCRs. For instance, a protein–protein interaction with the closely related A<sub>1</sub>R has been shown to allow adenosine to exert a fine-tuning modulation of glutamatergic neurotransmission [8]. Also, heteromerization with other GPCRs belonging to different families has been described and reviewed recently [9,10].

Despite the large amount of accumulated information on GPCR oligomerization, none of the approaches used up to now has revealed the occurrence of higher-order GPCR oligomers in living cells. In the present study, by means of a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay [11], we analyze the capability of A<sub>2A</sub>Rs to homodimerize. More importantly, we describe the combined use of BiFC and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) techniques as a tool to identify GPCR oligomers (e.g. A<sub>2A</sub>Rs oligomers) containing more than two protomers, thus allowing the detection of higher-order GPCR oligomers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plasmid constructs

Full length yellow fluorescence protein (YFP) was subcloned in the *Xho*I site of pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A C-terminal truncated version of YFP, named N-YFP (amino acids 1–155), was constructed by PCR amplification and cloned into the

\*Corresponding author. Fax: +34 934029082.  
E-mail address: fciruela@ub.edu (F. Ciruela).

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

XhoI site of pcDNA3.1 using the following primers: FnYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGTGAGCAAGGCGAGGAGC-3') and RnYFP (5'-CCGCTAGATCAGGCCATGATATAGACGTTG-3'). Also, a N-terminal truncated version of YFP, named C-YFP (amino acids 155–231), was made using the same strategy and the following primers: FcYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGACAAGCAGAA-GAACGGC-3') and RcYFP (5'-CCGCTAGATTACTTGTACAG-CTCGTCCAT-3'). The cDNAs encoding human A<sub>2A</sub>R and human  $\gamma$ -aminobutyric acid B1b receptor (GABA<sub>B1b</sub>R) were subcloned into pcDNA3.1 containing YFP constructs, thus containing in frame the sequences for YFP, N-YFP or C-YFP. A<sub>2A</sub>R was also subcloned into the EcoRI site of pRLuc-N1 (Perkin–Elmer, Waltham, MA, USA), thus containing in frame the sequence for *Renilla* luciferase (*Rluc*).

## 2.2. Cell culture, transfection and confocal microscopy

Human embryonic kidney (HEK-293) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 100  $\mu$ g/ml penicillin and 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) at 37 °C and in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. HEK cells growing up to 80% confluence in six-well plates, containing 20 mm coverslips when used for confocal microscopy, were transiently transfected with the DNA encoding the specified proteins by the polyethylenimine (PEI) method. Briefly, 10  $\mu$ g of DNA was diluted in 50  $\mu$ l of non-supplemented DMEM and mixed by pipetting with 75  $\mu$ l of 1 mg/ml PEI (Polysciences, Warrington, PA, USA). After 8 min incubation at room temperature, 450  $\mu$ l of supplemented DMEM were added and the resulting mixture was transferred to the 10 cm<sup>2</sup> well containing the cells. The cells were further incubated during 2 h, washed once with phosphate buffered saline (PBS) and placed in supplemented DMEM medium for 24 h at 37 °C, followed by another 24 h at 30 °C in order to allow proper fluorophore maturation [12]. Alternatively, cells were transiently transfected by the calcium precipitation technique [13].

Transiently, transfected HEK cells were fixed in 1% paraformaldehyde for 10 min, and washed with PBS containing 20 mM glycine to quench the remaining free aldehyde groups. Cells on coverslips were mounted with Vectashield immunofluorescence medium (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Microscope observations were made with an Olympus Fluoview 500 confocal scanning laser adapted to an inverted Olympus IX-70 microscope.

## 2.3. Membrane preparation, gel electrophoresis and immunoblotting

HEK cells were harvested at either 24 or 48 h after transfection. Membrane suspensions from transfected HEK cells were obtained as described previously [14]. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) was performed using 7.5% or 10% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to PVDF membranes using a semi-dry transfer system and immunoblotted with a mouse anti-A<sub>2A</sub>R monoclonal antibody (clone 7F6-G5-A2; 1:1000; UpState, Charlottesville, VA, USA) and then a horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (1:30000; Pierce, Rockford, IL, USA). The immunoreactive bands were developed using a chemiluminescent detection kit (Pierce) [15].

## 2.4. cAMP measurements

Transfected HEK-293 cells (3  $\times$  10<sup>6</sup> cell/sample) were incubated overnight in serum-free DMEM in the presence of 0.5 U/ml adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4; Roche, Basel, Switzerland). Before agonist challenge cells were preincubated with 50  $\mu$ M rolipram (Sigma–Aldrich) for 10 min and then stimulated with the indicated concentration of CGS21680 (Toocris, Bristol, UK), Forskolin (Ascent Scientific, Weston-Super-Mare, UK) or vehicle for another 10 min. After perchloric acid precipitation and potassium hydroxide neutralization the accumulated cAMP was measured by an Amersham cyclic AMP[<sup>3</sup>H] assay system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) as described in the manufacturer's manual. Briefly, 50  $\mu$ l of cAMP standards or neutralized samples were displayed in duplicate in assay tubes. Then 50  $\mu$ l of 1 pM cAMP[<sup>3</sup>H] were added together with 100  $\mu$ l of binding protein (cAMP soluble receptor) and incubated for 180 min at 4 °C. At the end of the incubation, 100  $\mu$ l of charcoal was added and tubes were shaken and centrifuged at 12000  $\times$  g for 6 min. Two hundred microliters of supernatant was counted in Wallac 1409 liquid scintillation spectrometer with 50% efficiency. Each time that cAMP was dosed a standard

curve was built with known concentration of cAMP from 1 to 16 pmol. Specific cAMP generation in each case was determined by calculating the difference between the cAMP accumulated in the stimulated vs. the non-stimulated transfected cells.

## 2.5. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments

HEK cells transiently transfected with a constant amount of cDNA encoding the A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup> and increasing amounts of A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>, GABA<sub>B2</sub>-R<sup>YFP</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>C-YFP</sup> plus A<sub>2A</sub>R<sup>N-YFP</sup> were detached, washed and resuspended in HBSS buffer containing 10 mM glucose. To control for cell number, protein concentration in the samples was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin dilutions as standards. Cell suspension (20  $\mu$ g protein) was distributed in duplicate into 96-well microplates (black plates with a transparent bottom for fluorescence measurement or white plates with white bottom for BRET determination). Fluorescence and bioluminescence readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, DLReady, Germany) that allows the integration of the signals detected in the filter at 485 nm (440–500 nm, maximum in bioluminescence emission) and 530 nm (510–590 nm, maximum in YFP emission). YFP fluorescence was defined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only Rluc-tagged receptor. For BRET measurement, 5  $\mu$ M *h*-coelenterazine (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added to the samples and readings were performed after 1 min (net BRET determination) and 10 min (Rluc luminescence quantification). BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by YFP (510–590 nm) over the light emitted by the Rluc (440–500 nm). The net BRET values were obtained by subtracting the BRET background signal detected when Rluc-tagged construct was expressed alone. Curves were fitted using non-linear regression and one-phase exponential association fit equation (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. Expression of A<sub>2A</sub>R fusion proteins

The fusion proteins A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>, A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>, A<sub>2A</sub>R<sup>N-YFP</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>C-YFP</sup>, as well as the A<sub>2A</sub>R<sup>wt</sup> were transiently transfected into HEK cells. As shown in Fig. 1A the constructs displayed the expected molecular size as determined by immunoblotting. Briefly, the mouse anti-A<sub>2A</sub>R antibody immunodetected a band of ~42 kDa in extracts from HEK cells transiently transfected with the human A<sub>2A</sub>R<sup>wt</sup> (Fig. 1A). This band did not appear in extracts of mock transfected cells (Fig. 1A). Meanwhile, the same antibody detected a band of ~69, ~78, ~60 and ~52 kDa in extracts from HEK cells transiently transfected with A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>, A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>, A<sub>2A</sub>R<sup>N-YFP</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>C-YFP</sup>, respectively (Fig. 1A).

To validate the functionality of these A<sub>2A</sub>R constructs, we also tested their signalling capability. As mentioned above, A<sub>2A</sub>Rs are coupled to G<sub>as</sub> proteins, thus activating adenylyl cyclase and increasing the intracellular levels of cAMP (Fig. 1B). In HEK cells transiently expressing A<sub>2A</sub>R constructs, agonist challenge induced a significant and comparable increase in cAMP accumulation in all the constructs tested when compared to the mock transfected cells (Fig. 1B), thus indicating that these C-terminal tagged A<sub>2A</sub>R are functional.

### 3.2. Homodimerization of A<sub>2A</sub>R determined by BiFC

The adenosine receptor homodimerization has been characterized by means of several methodological approaches, including FRET and BRET techniques [7,8,16]. The BiFC assay, a protein fragment complementation method [17], is based on the ability to produce a fluorescent complex from non-fluorescent constituents if a protein–protein interaction occurs [11].

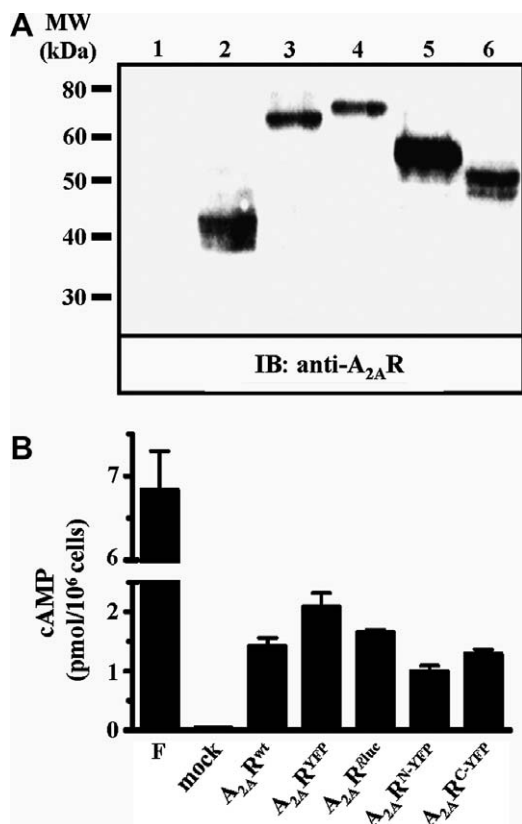


Fig. 1. Expression of  $A_{2A}R$  fusion proteins. (A) Immunoblot detection of  $A_{2A}R$  fusion proteins in HEK-293 cells. HEK-293 cells mock transfected (lane 1) or transiently expressing  $A_{2A}R^{wt}$  (lane 2),  $A_{2A}R^{YFP}$  (lane 3),  $A_{2A}R^{Rluc}$  (lane 4),  $A_{2A}R^{N-YFP}$  (lane 5) and  $A_{2A}R^{C-YFP}$  (lane 6) were washed and membranes processed for immunoblotting (see Section 2). Samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using a mouse anti- $A_{2A}R$  as a primary antibody and horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (1/30000) as a secondary antibody. (B) cAMP accumulation. Cells mock transfected or transiently expressing  $A_{2A}R^{wt}$ ,  $A_{2A}R^{YFP}$ ,  $A_{2A}R^{Rluc}$ ,  $A_{2A}R^{N-YFP}$  and  $A_{2A}R^{C-YFP}$  were preincubated overnight with 0.5 U/ml adenosine deaminase and stimulated for 10 min with vehicle, 10  $\mu$ M forskolin (F) or 200 nM CGS21680 (CGS) and the specific cAMP accumulation was determined (see Section 2). The results are expressed as means  $\pm$  S.D. of three independent experiments performed in duplicate.

The BiFC approach is used for the analysis of protein interactions in the normal cellular environment, enabling visualization of the subcellular locations of protein interactions in living cells [18]. To this end, adenosine  $A_{2A}$  receptors fused to the C terminal with full length YFP or with C-YFP and N-YFP fragments were generated and transfected into HEK cells. Interestingly, as receptor homodimerization caused YFP reconstitution, thus allowing fluorescence detection, we were able to visualize  $A_{2A}R$  homodimers in living cells (Fig. 2). It is important to note that cells single transfected with  $A_{2A}R$  containing the C-YFP or N-YFP fragments in their C-terminal tail did not provide a positive fluorescent signal as these YFP fragments are not fluorescent by their own (Fig. 2). It has been previously shown that fluorescent protein fragments are able to complement with low efficiency, thus forming fluorescent complexes, even in the absence of a specific interaction [11]. To ensure that receptor homodimerization was not driven by spontaneous YFP complementation we design some controls.

The most appropriate negative controls for this technique are fusion proteins that are expressed in the same subcellular compartment and that behave likewise to that under study but that are not able to interact with. In this study and besides some potential limitations we have used another GPCR as a negative control, namely the human  $GABA_{B1b}$  receptor. Thus, under the same experimental conditions, we were not able to detect fluorescence complementation between the  $A_{2A}R$  and the human  $GABA_{B1b}$  receptor (data not shown). Overall, these results corroborate that the  $A_{2A}R$  homodimerization in living cells is a specific phenomenon, a fact that has been previously demonstrated by other approaches [7].

### 3.3. Combined BRET/BiFC assays in the study of adenosine receptor oligomerization

In the past, the existence of  $A_{2A}R$  homodimers has been demonstrated by using a combination of biochemical and biophysical techniques. More recently, the time resolved-FRET (TR-FRET) approach revealed that these  $A_{2A}R$  homodimers occur at the plasma membrane level [7]. Now, to test the existence of higher-order  $A_{2A}R$  oligomers, we designed a new experimental approach consisting in the combination of BRET and BiFC techniques (Fig. 3A). Interestingly, we found that the optimum transfection ratio for  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  was 1:1 and that the spectral characteristics of the complemented YFP were unaltered when compared to those of the full YFP (Fig. 3B).

We also determined the  $A_{2A}R$  homodimer-mediated YFP-complementation efficiency for the  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  pair. As shown in Fig. 3C the fluorescence yield of the YFP-complemented  $A_{2A}R$  homodimer ( $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ) stands below the  $A_{2A}R^{YFP}$  fluorescence, as expected. Several aspects need to be taken into account: for instance, the occurrence of non-fluorescent homodimer species (e.g.  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{N-YFP}$  and  $A_{2A}R^{C-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ) will reduce BiFC efficiency.

Taking into account these experimental conditions, we performed a BRET saturation curve in cells co-transfected with a constant amount of the  $A_{2A}R^{Rluc}$  construct and increasing concentrations of the  $A_{2A}R^{YFP}$  or  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  plasmids. A positive BRET signal for the transfer of energy between  $A_{2A}R^{Rluc}$  and  $A_{2A}R^{YFP}$  was obtained (Fig. 3D). The BRET signal increased as a hyperbolic function of the concentration of the YFP-fusion construct added (assessed by the fluorescence emitted upon direct excitation at 480 nm) until reaching an asymptote. As the  $A_{2A}R^{Rluc}/GABA_{B2}^{YFP}$  pair led to an undetectable BRET signal (Fig. 3D), the hyperbolic BRET signal found for the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$  indicates that the interaction between two  $A_{2A}R$  molecules is specific, in agreement with previously described results [7]. Interestingly, we also found a positive BRET signal that increases as hyperbolic function of the homodimer-mediated complemented YFP, thus suggesting the formation of  $A_{2A}R$  oligomers containing more than two protomers (Fig. 3D). It is important to note here that the increment in the BRET ratio observed for the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$  and  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  pairs is due to an enhancement on the 527 nm emission signal (YFP) after addition of *h*-coelenterazine and not by a decrement on the 475 nm emission signal (*Rluc*) by just a quenching/overexpression phenomenon, as expected for a specific BRET signal (Fig. 3C).

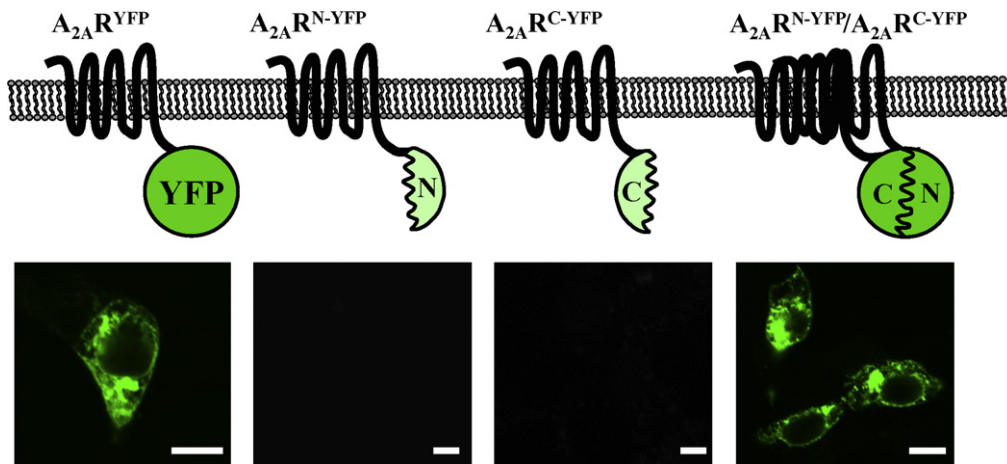


Fig. 2. Visualization of  $A_{2A}R$  homodimers by BiFC assays. HEK cells were transiently transfected with 10  $\mu$ g of the cDNA encoding  $A_{2A}R^{YFP}$ ,  $A_{2A}R^{N-YFP}$ ,  $A_{2A}R^{C-YFP}$  and  $A_{2A}R^{N-YFP}$  (5  $\mu$ g) plus  $A_{2A}R^{C-YFP}$  (5  $\mu$ g) and processed for confocal microscopy imaging. Microscope observations were made with Olympus Fluoview 500 confocal scanning laser adapted to an inverted Olympus IX-70 microscope. An explanatory schematic representation illustrating the receptor species expressed on the plasma membrane of cells is shown on the top. Scale bar: 10  $\mu$ m.

On the other hand, the maximum energy transfer ( $BRET_{max}$ ) observed for the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  pair is 4.5 times lower than the observed for the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$  pair ( $BRET_{max}$  of  $55 \pm 6$  vs.  $250 \pm 15$ ). This is an expected result since the fluorescence values ( $x$  values) are different for the two curves. For the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$  pair the fluorescence value is proportional to the sum of the concentrations of  $A_{2A}R^{YFP}$  (monomer) plus  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{YFP}$  (dimer) plus higher oligomers. On the other hand, for the  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  pair the fluorescence value is proportional to the sum of the concentrations of  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  (dimer) plus  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  (trimer) plus higher oligomers. Thus, different binding constants are involved here, for instance the one for the monomer–monomer interaction and the binding constant for the monomer–dimer interaction. Also, not all homodimers (e.g.  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}$ ,  $A_{2A}R^{C-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  and  $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{N-YFP}$ ) and oligomers (e.g.  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{N-YFP}$  and  $A_{2A}R^{Rluc}/A_{2A}R^{C-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ) are fluorescent and within the fluorescent ones not all of them will have the same fluorescence level to engage with the same efficiency in a BRET process. Finally, the orientation of the donor ( $A_{2A}R^{Rluc}$ ) and acceptor (fluorescent receptor species) within the oligomer might be crucial as the BRET efficiency also depends on the orientation angle of these two molecules, like the position of a radio antenna can influence its reception [19]. All these considerations add complexity to the system and deserve some thought. On the other hand, the concentration of acceptor giving 50% of the maximum energy transfer ( $BRET_{50}$ ), that somehow reflects the ability to interact, is lower for the  $A_{2A}R^{Rluc}-A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$  oligomer when compared with the  $A_{2A}R^{Rluc}-A_{2A}R^{YFP}$  pair ( $BRET_{50}$  of  $1.1 \pm 0.3$  vs.  $5.2 \pm 1.2$ ). Overall, these results might reflect different modes of interaction within the oligomer, for instance cooperativity phenomena within the different oligomeric species should be taken into account in future studies.

#### 4. Discussion

Several experimental approaches have been used in the study of the quaternary structure of GPCRs, revealing the existence

of receptor homo- and heteromers [6]. Among these approaches, fluorescence-based methods, as non-invasive techniques, have played a key role in the characterization of a large array of protein–protein interactions in general and in the study of GPCR oligomerization in particular [19]. We now show that the combined use of the BRET and BiFC techniques allows the detection of GPCRs oligomers composed for more than two protomers.

The homodimerization of  $A_{2A}R$ s has been previously described by using biochemical and biophysical approaches [7]. Interestingly, by means of cell surface biotinylation experiments it has been demonstrated that around 90% of the cell surface  $A_{2A}R$  species exist as a homodimeric structures, thus suggesting that  $A_{2A}R$  homodimers are the functional form of the receptor present on the plasma membrane of living cells. In the present study, we were able to visualize  $A_{2A}R$  homodimers by using a new fluorescence approach, the BiFC assay. This fluorophore-based method, largely used in the field of plant sciences [20], enables direct visualization of protein interactions in living cells [11] and is likely to develop into a standard technique for the identification, verification and in detail characterization of protein–protein interactions. Here, we implemented the use of this approach to the study of GPCR oligomerization, a field where it has not been widely used [21]. Thus, by means of this technique we showed that the subcellular distribution of the YFP-complemented receptor was not apparently different from that observed for the C-terminal YFP-labelled  $A_{2A}R$  protomers, suggesting either that all receptor species are homodimeric or that there are no differences in the subcellular distribution of the diverse receptor species (e.g. monomers vs. homodimers).

After a period of initial resistance from the scientific community to accept the existence of GPCRs oligomers, this concept is now changing and expanding classical pharmacodynamic concepts. Thus, GPCRs cannot be considered as single functional elements only, but should also be seen as forming part of multiprotein complexes localized at the plasma membrane level. These receptor multiprotein complexes or “receptorsomes”, which might contain not only receptor oligomers but also signalling and scaffolding proteins, are responsible for the molecular and functional integration of receptor signalling. As part

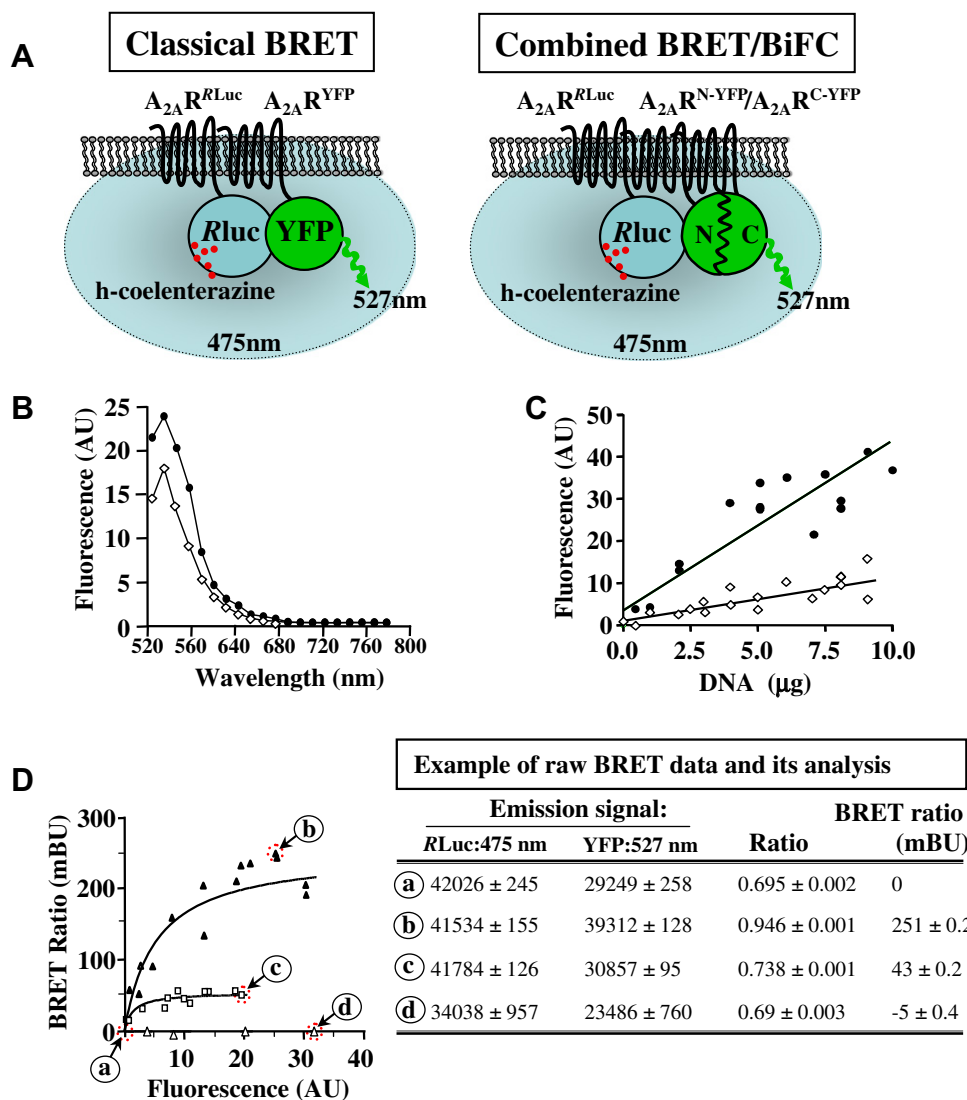


Fig. 3. Detection of high-order  $A_{2A}R$  oligomers by combined BRET/BiFC assays. (A) Schematic representation comparing the classical BRET and the combined BRET/BiFC assays. BRET signal is triggered by the oxidation of *h*-coelenterazine by the *Rluc* fused to the C-terminal tail of the  $A_{2A}R^{RLuc}$  construct. This enzymatic reaction produces light emission at the indicated wavelength (475 nm), which might excite a proper fluorophore acceptor found in close proximity. As acceptor we can use YFP-fused to  $A_{2A}R$  ( $A_{2A}R^{YFP}$ ) or even  $A_{2A}R$  homodimer-mediated complemented-YFP ( $A_{2A}R^{N-YFP}/A_{2A}R^{C-YFP}$ ) that after excitation results in an emission at 527 nm. If the fusion proteins are in close proximity (within 10 nm) bioluminescent resonance energy transfer (BRET) can occur. (B) Spectral emission profile of  $A_{2A}R^{YFP}$  (●) and  $A_{2A}R$  homodimer-mediated complemented YFP (◇). (C) Efficiency of the homodimer-mediated YFP complementation. HEK cells were transiently transfected with increasing amounts of cDNA encoding  $A_{2A}R^{YFP}$  (●) or the same total amount of cDNA encoding  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  (◇). The fluorescence of each sample was measured (see Section 2) and expressed in arbitrary units 1000× (AU). (D) BRET saturation curve. BRET was measured in HEK cells coexpressing  $A_{2A}R^{RLuc}$  and  $A_{2A}R^{YFP}$  (▲),  $A_{2A}R^{RLuc}$  and  $A_{2A}R^{N-YFP} + A_{2A}R^{C-YFP}$  (□) or  $A_{2A}R^{RLuc}$  and  $GABA_{B2}R^{YFP}$  (△) constructs. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid DNA for the YFP construct, whereas the DNA for the *Rluc* construct was maintained constant. Both fluorescence and luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm equal expression of *Rluc* while monitoring the increase of YFP expression (see Section 2). On the right an example of raw BRET data is shown. The selected points from the graph on the left (red dotted encircled points) are derived from data generated in the same experiment (see Section 2). The luminescence (*Rluc*: 475 nm) and fluorescence (YFP: 527 nm) emission signals after *h*-coelenterazine addition, together with the corresponding BRET ratios, are provided.

of the receptorsome, receptor oligomers play a key function not only in signal triggering but also in orchestrating the molecular events which result in plasticity-associated changes. Oligomer stoichiometry might therefore be decisive in determining proper receptor function; thus, knowledge of GPCR oligomer composition is essential for the study of molecular interventions in disorders where these receptors have been shown to be involved, and may provide novel therapeutic targets for the treatment of a number of diseases. Here, by using a new experimental

approach, we determined that  $A_{2A}R$  homomers can be formed by more than two protomers, suggesting that the existence of higher-order GPCRs oligomers might be a general phenomenon within this receptor superfamily. Next, it will be necessary to determine if these putative higher-order GPCR's are expressed at the cell surface of living cells, a fact that will be more relevant from the biological point of view. In our hands, by using the combined BRET–BiFC technique we were not able to determine the precise subcellular localization of these high-



er-order A<sub>2A</sub>R oligomers, but by doing other BiFC technical combinations, for instance with FRET approaches it will be potentially possible to detect the cell surface expression of these oligomers. Indeed, identification of ternary protein complexes by using a BiFC-based FRET has been recently described [22]. Overall, the use of these new experimental approaches will allow us to better understand how signals within multiprotein complexes are integrated at the molecular level.

*Acknowledgement:* This work was supported by Grant SAF2005-00903 to F.C. from Ministerio de Educación y Ciencia.

## References

- [1] Dunwiddie, T.V. and Masino, S.A. (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55.
- [2] Marala, R.B. and Mustafa, S.J. (1993) Direct evidence for the coupling of A<sub>2</sub>-adenosine receptor to stimulatory guanine nucleotide-binding-protein in bovine brain striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 294–300.
- [3] Seidel, M.G., Klinger, M., Freissmuth, M. and Holler, C. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinase by the A<sub>2A</sub>-adenosine receptor via a rap1-dependent and via a p21(ras)-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 25833–25841.
- [4] Sexl, V., Mancusi, G., Holler, C., Gloria-Maercker, E., Schutz, W. and Freissmuth, M. (1997) Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A<sub>2A</sub>-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 5792–5799.
- [5] Agnati, L.F., Ferre, S., Lluis, C., Franco, R. and Fuxe, K. (2003) Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* 55, 509–550.
- [6] Milligan, G. and Bouvier, M. (2005) Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *FEBS J.* 272, 2914–2925.
- [7] Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E.I., Mallol, J., Agnati, L., Ferre, S., Bouvier, M., Fuxe, K., Ciruela, F., Lluis, C. and Franco, R. (2004) Homodimerization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* 88, 726–734.
- [8] Ciruela, F., Casado, V., Rodrigues, R.J., Lujan, R., Burgueno, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., Cortes, A., Canela, E.I., Lopez-Gimenez, J.F., Milligan, G., Lluis, C., Cunha, R.A., Ferre, S. and Franco, R. (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers. *J. Neurosci.* 26, 2080–2087.
- [9] Ferre, S., Agnati, L.F., Ciruela, F., Lluis, C., Woods, A.S., Fuxe, K. and Franco, R. (2007) Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in ‘local modules’: the striatal spine module. *Brain Res. Rev.* 55, 55–67.
- [10] Ferre, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluis, C. and Franco, R. (2007) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 30, 440–446.
- [11] Kerppola, T.K. (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* 1, 1278–1286.
- [12] Schmidt, U., Richter, K., Berger, A.B. and Lichter, P. (2006) In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J. Cell Biol.* 172, 373–381.
- [13] Jordan, M., Schallhorn, A. and Wurm, F.M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* 24, 596–601.
- [14] Burgueno, J., Enrich, C., Canela, E.I., Mallol, J., Lluis, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2003) Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* 86, 785–791.
- [15] Ciruela, F. and McIlhinney, R.A. (1997) Differential internalisation of mGluR1 splice variants in response to agonist and phorbol esters in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* 418, 83–86.
- [16] Ciruela, F., Casado, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluis, C. and Franco, R. (1995) Immunological identification of A<sub>1</sub> adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* 42, 818–828.
- [17] Kerppola, T.K. (2006) Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat. Method* 3, 969–971.
- [18] Hu, C.D., Grinberg, A.V. and Kerppola, T.K. (2006) Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, (Chapter 21, Unit 21.3).
- [19] Gandia, J., Lluis, C., Ferre, S., Franco, R. and Ciruela, F. (2008) Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *Bioessays* 30, 82–89.
- [20] Bhat, R.A., Lahaye, T. and Panstruga, R. (2006) The visible touch: in planta visualization of protein–protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant. Method* 2, 12.
- [21] Lopez-Gimenez, J.F., Canals, M., Padiani, J.D. and Milligan, G. (2007) The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol. Pharmacol.* 71, 1015–1029.
- [22] Shyu, Y.J., Suarez, C.D. and Hu, C.D. (2008) Visualization of AP-1 NF-kappaB ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 151–156.

## **ANEXO II**



## Metabotropic glutamate type 5, dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors form higher-order oligomers in living cells

Nuria Cabello,\* Jorge Gandía,† Daniela C. G. Bertarelli,\* Masahiko Watanabe,‡ Carme Lluís,\* Rafael Franco,\* Sergi Ferré,§ Rafael Luján¶ and Francisco Ciruela†

\*IDIBAPS, CIBERNED and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

†Unitat de Farmacologia, Departament Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

‡Department of Anatomy, Hokkaido University, School of Medicine, Sapporo, Japan

§Behavioral Neuroscience Branch, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, USA

¶Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Medicina-CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

### Abstract

G protein-coupled receptors are known to form homo- and heteromers at the plasma membrane, but the stoichiometry of these receptor oligomers are relatively unknown. Here, by using bimolecular fluorescence complementation, we visualized for the first time the occurrence of heterodimers of metabotropic glutamate mGlu<sub>5</sub> receptors (mGlu<sub>5</sub>R) and dopamine D<sub>2</sub> receptors (D<sub>2</sub>R) in living cells. Furthermore, the combination of bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence resonance energy transfer techniques, as well as the sequential resonance energy transfer technique, allowed us to detect the occurrence receptor oligomers containing more than two protomers, mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and adenosine A<sub>2A</sub> receptor (A<sub>2A</sub>R). Interestingly, by using high-resolution

immunoelectron microscopy we could confirm that the three receptors co-distribute within the extrasynaptic plasma membrane of the same dendritic spines of asymmetrical, putative glutamatergic, striatal synapses. Also, co-immunoprecipitation experiments in native tissue demonstrated the existence of an association of mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R in rat striatum homogenates. Overall, these results provide new insights into the molecular composition of G protein-coupled receptor oligomers in general and the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer in particular, a receptor oligomer that might constitute an important target for the treatment of some neuropsychiatric disorders.

**Keywords:** adenosine, dopamine, G protein-coupled receptors, glutamate, receptor oligomerization.

*J. Neurochem.* (2009) **109**, 1497–1507.

The striatum receives the densest dopamine innervation and contains the highest concentration of dopamine receptors in the brain (Lindvall and Bjorklund 1978; Gerfen 2004). As a consequence, dopamine plays a key role in motor activity and goal-directed behaviors and also in the pathophysiology of diverse disorders, including Parkinson's disease and drug addiction (Ferre *et al.* 2004). Dopamine acts on G protein-coupled receptors (GPCRs) that, based on sequence homologies and pharmacological profiles, have been classified in D<sub>1</sub>-like, which include D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors, and D<sub>2</sub>-like receptors, which comprise the long and short isoforms of the D<sub>2</sub> receptor (termed D<sub>2L</sub> and D<sub>2S</sub>, respectively), the D<sub>3</sub> and the D<sub>4</sub> receptors (Missale *et al.* 1998). The striatum also

Received March 4, 2009; revised manuscript received March 17, 2009; accepted March 24, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Francisco Ciruela, Unitat de Farmacologia, Departamento de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina (Campus de Bellvitge), Pavelló de Govern, Av. Feixa Llarga, s/n 08907 L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. E-mail: fciruela@ub.edu

**Abbreviations used:** A<sub>2A</sub>R, A<sub>2A</sub> receptor; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; BRET, bioluminescence energy transfer; D<sub>2</sub>R, D<sub>2</sub> receptors; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GPCR, G protein-coupled receptor; HEK, human embryonic kidney; HRP, horseradish-peroxidase; IP, immunoprecipitates; RIPA, ristocetin-induced platelet agglutination; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SRET, sequential resonance energy transfer; TBS, Tris-buffered saline; YFP, yellow fluorescent protein.

receives a dense glutamatergic innervation from cortical, thalamic and limbic areas (Gerfen 2004). Several classes of glutamate receptors, widely distributed in the CNS, have been characterized: three subtypes of ionotropic glutamate (iGlu) receptors and a family of GPCRs, called metabotropic glutamate (mGlu) receptors, which act through different second messenger pathways. Eight members of the mGlu receptors family have been identified and categorized into three subgroups on the basis of their sequence homology, agonist selectivity and signal transduction pathway. Group I contains mGlu<sub>1</sub> and mGlu<sub>5</sub> receptor subtypes, which are coupled to phospholipase C in transfected cells and have quisqualic acid (Quis) as the most potent agonist.

In addition to dopamine and glutamate, adenosine plays a key role in basal ganglia function (Ferre *et al.* 1997). Adenosine seems to be mainly produced by metabolism of ATP co-released with glutamate from nerve terminals and astrocytes (Ferre *et al.* 2007a) and mediates its actions by specific GPCRs, which are currently classified in A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub> subtypes (Fredholm *et al.* 2001). Compared to the other adenosine receptor subtypes, A<sub>2A</sub> receptors (A<sub>2A</sub>Rs) are particularly concentrated in the striatum (Ferre *et al.* 1997; Rosin *et al.* 1998), where they are mostly expressed by GABAergic striatopallidal neurons (Schiffmann *et al.* 1991, 2007). Interestingly, ultrastructural analysis has demonstrated that A<sub>2A</sub>Rs are localized mostly post-synaptically in the dendrites and dendritic spines of striatal GABAergic neurons (Hettinger *et al.* 2001). A<sub>2A</sub>R immunoreactivity was observed primarily at glutamatergic (asymmetric) synapses, predominantly at the post-synaptic but also at the pre-synaptic site (Hettinger *et al.* 2001; Ciruela *et al.* 2006a). Therefore, it has been suggested that A<sub>2A</sub>R plays a key role in the fine-tuning modulation of glutamatergic neurotransmission in striatal GABAergic neurons both at the post-synaptic and pre-synaptic level (Hettinger *et al.* 2001; Ciruela *et al.* 2006a,b; Ferre *et al.* 2007a,b).

In the GABAergic striatopallidal neurons A<sub>2A</sub>R are co-localized with D<sub>2</sub> receptors (D<sub>2</sub>R), and establish functional A<sub>2A</sub>R-D<sub>2</sub>R heteromers (Ferre *et al.* 2007a,b) and, in the striatopallidal complex in primates, mGlu<sub>5</sub> receptor (mGlu<sub>5</sub>R) showed a very similar localization to that described for A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R in rats (Paquet and Smith 2003). Furthermore, evidence has been provided for the existence of A<sub>2A</sub>R-mGlu<sub>5</sub>R heteromerization in transfected cells and in rat striatum (Ferre *et al.* 2002). Significantly, multiple interactions between striatal A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R were described at the biochemical and behavioral level (Popoli *et al.* 2001; Fuxe *et al.* 2003; Ferre *et al.* 2007a,b, 2008), suggesting the possible existence of higher-order mGlu<sub>5</sub>R-D<sub>2</sub>R-A<sub>2A</sub>R oligomers. In the present study, for the first time, we provide evidence for the existence of mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by two different experimental approaches, namely the combined use of bimolecular fluorescence

complementation (BiFC) and bioluminescence energy transfer (BRET) (Gandia *et al.* 2008a) and by sequential resonance energy transfer (SRET) (Carriba *et al.* 2008). The existence of these higher-order receptor oligomeric complexes might be relevant to striatal function both in normal and pathological conditions (Ferré *et al.* 2003).

## Materials and methods

### Plasmid constructs

The cDNA encoding the mGlu<sub>5b</sub> receptor was subcloned into the *EcoRI/BamHI* sites of pGFP<sup>2</sup>-N3 (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) and pEYFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, USA) vector as previously described (Cabello *et al.* 2007). Also, the cDNA encoding dopamine D<sub>2</sub> receptor was amplified by PCR using the following primers: FD2Nhe (5'-CCGCGCTAGCATGGATCCACTGAATCTGTCC-3') and RD2Xho (5'-CCGCTCGAGCCGAGTG-GAGGATCTTCAGG-3') and cloned into the *NheI/XhoI* sites of pRluc-N1 vector (Perkin-Elmer). The other constructs used were previously described (Canals *et al.* 2003). For the bimolecular complementation experiments a C-terminal truncated version of yellow fluorescent protein (YFP), named N-YFP (amino acids 1–155), was made by PCR amplification and cloning into the *XhoI* site of pcDNA3.1 using the following primers: FnYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') and RnYFP (5'-CCGTCTAGATCAGGCCATGATATAGACGTTG-3'). Also, an N-terminal truncated version of YFP, named C-YFP (amino acids 155–231), was made using the same strategy and using the following primers: FcYFP (5'-CCGCTCGAGACCATGGACAAGCAGAAGAACGGC-3') and RcYFP (5'-CCGTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'). The cDNAs encoding the D<sub>2</sub>R, mGlu<sub>5b</sub>R, GABA<sub>B1b</sub>R and GABA<sub>B2</sub>R without their stop codon were subcloned into the *NheI/EcoRI* or *KpnI/EcoRI* sites of pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), thus containing in frame the sequences for N-YFP or C-YFP. Finally, the cDNA encoding A<sub>2A</sub>R and GABA<sub>B2</sub>R without their stop codon were amplified using sense and anti-sense primers harboring unique restriction enzyme sites and subcloned to be in-frame with Rluc in the pRluc-N1 vector or with EYFP in the pEYFP-N1 vector. Finally, besides the YFP constructs contained the start codon when these were compared to the same constructs lacking the initiation codon neither apparent difference in molecular size nor in the subcellular distribution was observed, thus suggesting that no apparent translation took place from this second initiation codon (data not shown).

### Antibodies

The primary antibodies used were: rabbit anti-A<sub>2A</sub>R whole serum (Ciruela *et al.* 2004), rabbit anti-A<sub>2A</sub>R polyclonal antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), mouse anti-A<sub>2A</sub>R monoclonal antibody (clone 7F6-G5-A2; Millipore, Billerica, MA, USA), rabbit anti-D<sub>2</sub>R whole serum (Levey *et al.* 1993; Bjelke *et al.* 1996; Jansson *et al.* 1999; Canals *et al.* 2003), rabbit anti-D<sub>2</sub>R polyclonal antibody (Millipore), goat anti-D<sub>2</sub>R polyclonal antibody (Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-D<sub>2</sub>R polyclonal antibody (Narushima *et al.* 2006), rabbit anti-mGlu<sub>5</sub>R polyclonal antibody (Millipore), guinea pig anti-mGlu<sub>5</sub>R polyclonal antibody (Uchigashima *et al.* 2007), mouse anti-GFP monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA). The secondary antibodies were: horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce, Rockford, IL, USA), HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Dako, Glostrup, Denmark), HRP-conjugated anti-rabbit IgG TrueBlot™ (eBioscience, San Diego, CA, USA), donkey anti-rabbit-Cy5™ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA), donkey anti-mouse-Cy3™ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), donkey anti-goat-Cy2™ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), goat anti-mouse IgG conjugated to 10 nm colloidal gold (1/100; Aurion, Wageningen, The Netherlands), goat anti-rabbit IgG conjugated to 15 nm colloidal gold (1/100; Aurion) and goat anti-guinea pig IgG conjugated to 20 nm colloidal gold (1/100; Aurion).

#### Cell culture, transfection and membrane preparation

Human embryonic kidney cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL streptomycin, 100 µg/mL penicillin and 10% (v/v) fetal bovine serum at 37°C and in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. HEK293 cells growing in 25 cm<sup>2</sup> flasks or in 6-well plates, containing 20 mm coverslips when used for confocal microscopy, were transiently transfected with the DNA encoding the specified proteins by the calcium phosphate precipitation technique (Jordan *et al.* 1996). The cells were harvested at either 24 or 48 h after transfection. Membrane suspensions from transfected HEK293 cells or from rat striatum were obtained as described previously (Burgueno *et al.* 2003).

#### Immunoprecipitation and immunostaining

For immunoprecipitation membranes from transiently transfected HEK cells or from rat striatum were solubilized in ice-cold radio immuno precipitation assay (RIPA) buffer [50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1 mM EDTA] for 30 min on ice. The solubilized preparation was then centrifuged at 13 000 *g* for 30 min. The supernatant (1 mg/mL) was processed for immunoprecipitation, each step of which was conducted with constant rotation at 0–4°C. The supernatant was incubated overnight with the indicated antibody. Then 40 µL of either a suspension of protein G cross linked to agarose beads or TrueBlot™ anti-Rabbit Ig immunoprecipitates (IP) Beads (eBioscience) were added and the mixture was incubated overnight. Subsequently, the beads were washed twice with ice-cold RIPA buffer, twice with ice cold RIPA buffer diluted 1 : 10 in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris HCl pH 7.4, 100 mM NaCl) and once with TBS and aspirated to dryness with a 28-gauge needle. Subsequently, 30 µL of SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer (8 M Urea, 2% SDS, 100 mM dithiothreitol, 375 mM Tris, pH 6.8) was added to each sample. Immune complexes were dissociated by heating to 37°C for 2 h and resolved by SDS–PAGE in 6.5% or 10% gels and immunoblotted as described above.

For immunocytochemistry transiently transfected HEK293 cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, and washed with phosphate buffered saline containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the remaining free aldehyde groups. Cells were permeabilized with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min. Blocking was done using buffer A containing 1% bovine serum albumin (buffer B). Cells were labeled for 1 h at 20°C with the

indicated primary antibody, washed for 30 min in buffer B and stained with the corresponding secondary antibodies for another hour. Samples were rinsed and observed in a confocal microscope (Sarrío *et al.* 2000; Lujan and Ciruela 2001).

For electron microscopy, ultrathin sections (70–90 nm) from three Lowicryl-embedded blocks were incubated for 45 min on pioloform-coated nickel grids with drops of blocking solution consisting of 2% albumin in 0.05 M TBS, 0.9% NaCl and 0.03% Triton X-100. The grids were transferred to a mixture solution A2AR, D2R and mgluR5 antibodies at a final protein concentration of 10 µg/mL diluted in blocking solution overnight at 20°C. After several washes in TBS, grids were incubated for 2 h in drops of a mixture of goat anti-mouse IgG conjugated to 10 nm-colloidal gold particles, goat anti-rabbit IgG conjugated to 15 nm-colloidal gold particles and goat anti-guinea pig IgG conjugated to 20 nm-colloidal gold particles (Aurion), each diluted 1 : 100 in a 0.05 M TBS solution containing 2% normal human serum and 0.5% polyethylene glycol. Grids were then washed in TBS for 30 min and counterstained for electron microscopy with saturated aqueous uranyl acetate and lead citrate. Ultrastructural analyses were performed in a Jeol-1010 electron microscope. Electron photomicrographs were captured with CCD camera (Mega View III; Soft Imaging System, Münster, Germany). Digitized electron images were then modified for brightness and contrast by using Adobe PhotoShop CS1 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) to optimize them for printing.

#### Gel electrophoresis and immunoblotting

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis was performed using 7.5 or 10% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes using a semi-dry transfer system and immunoblotted with the indicated antibody and then HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/30 000), HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1/5000) or HRP-conjugated anti-rabbit IgG TrueBlot™ (1/1000). The immunoreactive bands were developed using a chemiluminescent detection kit (Pierce) (Ciruela and McIlhinney 1997).

#### Resonance energy transfer-based methods

For BRET experiments HEK cells transiently transfected with a constant amount of cDNA encoding the D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup> and increasing amounts of A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> or CD<sub>4</sub>R<sup>YFP</sup> were detached, washed and resuspended in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffer containing 10 mM glucose. To maintain the same ratio of DNA in co-transfections, we used empty vector, pcDNA3.1, to equilibrate the amount of total DNA transfected. To control for cell number, protein concentration in the samples was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using bovine serum albumin dilutions as standards. Cell suspension (20 µg protein) was distributed in duplicate into 96-well microplates (black plates with a transparent bottom for fluorescence measurement or white plates with white bottom for BRET determination). Fluorescence and bioluminescence readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) that allows the integration of the signals detected in the filter at 485 nm (440–500 nm, maximum in bioluminescence emission) and 530 nm (510–590 nm, maximum in YFP emission). YFP fluorescence was defined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only Rluc-tagged receptor. For BRET measurement,

5  $\mu$ M h-coelenterazine (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added to the samples and readings were performed after 1 min (net BRET determination) and 10 min (*Rluc* luminiscence quantification). BRET signal was determined by calculating the ratio of the light emitted by YFP (510–590 nm) over the light emitted by the *Rluc* (440–500 nm). The net BRET values were obtained by subtracting the BRET background signal detected when *Rluc*-tagged construct was expressed alone. Curves were fitted using nonlinear regression and one-phase exponential association fit equation (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

Displacement studies were performed at a constant BRET ratio, around the BRET<sub>50</sub> of the A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>/D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup> pair, and increasing amounts of mGlu<sub>5</sub>R or CD<sub>4</sub>R constructs. The BRET values were expressed as a percentage of the BRET<sub>50</sub> of the mGlu<sub>5</sub>R non-transfected cells and better fitted to a two site competition curve using nonlinear regression (GraphPad Prism).

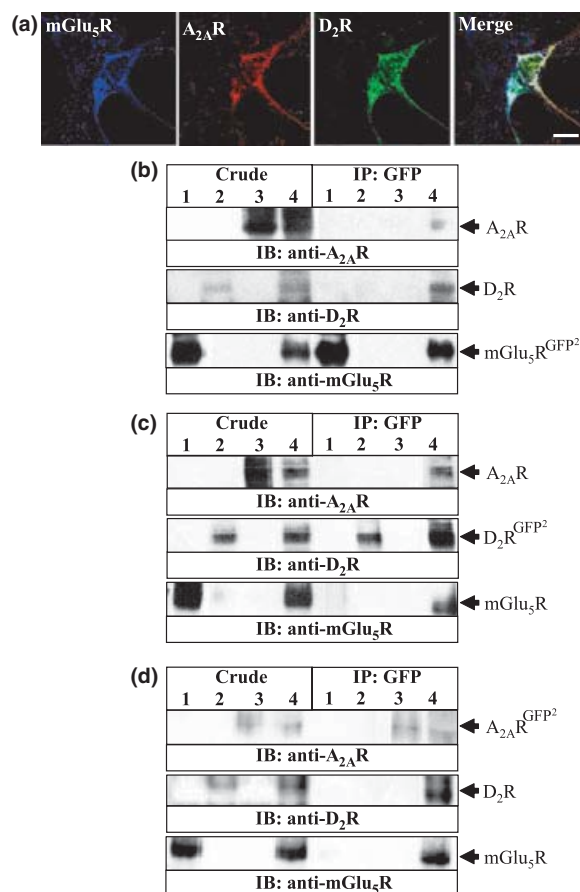
The combined BRET-bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay was performed as described recently (Gandia *et al.* 2008a). Briefly, cells transfected with indicated plasmids were placed in Dulbecco's modified Eagle's medium for 24 h at 37°C, followed by another 24 h at 30°C in order to allow proper the maturation of complemented fluorophore (Schmidt *et al.* 2006). After transfection cells were processed for BRET measurements as described above.

For SRET experiments HEK293 cells were transiently co-transfected with plasmid encoding D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> (2  $\mu$ g), mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (4  $\mu$ g) and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> (6  $\mu$ g for a single SRET experiment or increasing amounts for SRET curves), as described previously (Carriba *et al.* 2008). Fluorescence and luminescence were determined as described above. For SRET measurements cells were distributed in 96-white well microplates and 5  $\mu$ M DeepBlueC (Molecular Probes) was added. SRET signal was collected in a Mithras LB 940 using the detected filters at short-wavelength at 485 nm (440–500 nm) and at long-wavelength at 530 nm (510–590 nm). Here, we express net SRET as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for cells expressing D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup>, mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (Carriba *et al.* 2008). Curves were fitted as described above.

## Results

### Investigation of mGlu<sub>5</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R oligomerization by classical biochemical approaches

The association of the D<sub>2</sub>R with mGlu<sub>5</sub>R and A<sub>2A</sub>R was first studied by classical biochemical approaches, namely immunolabeling experiments and co-immunoprecipitation assays. Thus, by means of confocal microscopy analysis of HEK293 cells transiently transfected with the cDNAs encoding for the D<sub>2</sub>R, A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R some overlapping in the distribution of the three receptors was found (Fig. 1a). Interestingly, it is important to mention here that around 70% of the cells were simultaneously expressing all three receptors. Next, the existence of mGlu<sub>5</sub>R/A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R oligomers was subsequently assayed by co-immunoprecipitation experiments. From extracts of HEK293 cells transfected with mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup>



**Fig. 1** Heteromerization in HEK cells. Immunofluorescence localization of mGlu<sub>5</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R in transiently transfected HEK293 cells (panel a). Cells were transiently co-transfected with the cDNA's encoding mGlu<sub>5</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R and processed for immunostaining (see Materials and methods) using a rabbit anti-mGlu<sub>5</sub>R, a mouse anti-A<sub>2A</sub>R and a goat anti-D<sub>2</sub>R. The bound primary antibody was detected using donkey-anti-rabbit-Cy5 (1/500), donkey-anti-mouse-Cy3 (1/500) and donkey-anti-goat-Cy2 (1/500). Superimposition of images reveals a high receptor co-distribution in white (merge). Scale bar: 10  $\mu$ m. Co-immunoprecipitation assays in HEK293 cells (panels b, c and d). (b) Cells were transiently transfected with mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (lane 1), D<sub>2</sub>R (lane 2), A<sub>2A</sub>R (lane 3) or with all three receptors simultaneously (lane 4). (c) Cells were transiently transfected with mGlu<sub>5</sub>R (lane 1), D<sub>2</sub>R<sup>GFP2</sup> (lane 2), A<sub>2A</sub>R (lane 3) or with all three receptors simultaneously (lane 4). (d) Cells were transiently transfected with mGlu<sub>5</sub>R (lane 1), D<sub>2</sub>R (lane 2), A<sub>2A</sub>R<sup>GFP2</sup> (lane 3) or with all three receptors simultaneously (lane 4). Cells were washed, solubilized and processed for immunoprecipitation using anti-GFP monoclonal antibody (2  $\mu$ g/ml; IP: GFP). Solubilized membranes (Crude; 20  $\mu$ g) and immunoprecipitates (IP) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using rabbit anti-A<sub>2A</sub>R whole serum (1/2000), rabbit anti-D<sub>2</sub>R whole serum (1/2000) or rabbit anti-mGlu<sub>5</sub>R polyclonal antibody (1  $\mu$ g/mL) and horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG as a secondary antibody. These blots are representative of four different experiments with similar qualitative results.

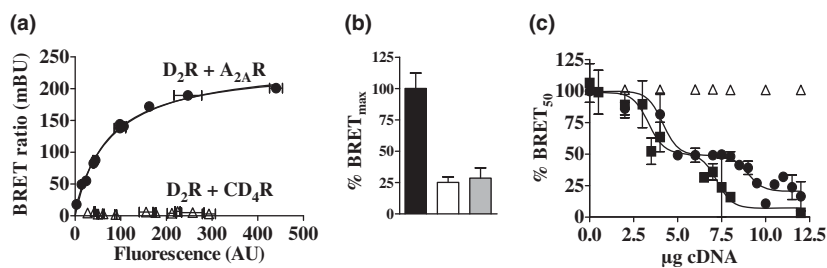
(Fig. 1b, lane 1), D<sub>2</sub>R (Fig. 1b, lane 2), A<sub>2A</sub>R (Fig. 1b, lane 3) or with A<sub>2A</sub>R plus D<sub>2</sub>R plus mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (Fig. 1b, lane 4) the mouse monoclonal antibody against GFP, which recognizes all GFP variants, immunoprecipitated a band of ~160 kDa, which corresponds to the mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (Fig. 1b, IP: GFP, lanes 1 and 4, lower panel). This band did not appear in immunoprecipitates from cells transfected only with the cDNA encoding for D<sub>2</sub>R (Fig. 1b, lane 2, lower panel) or A<sub>2A</sub>R (Fig. 1b, lane 3, lower panel) or when an irrelevant antibody was used (data not shown). Interestingly, when immunoprecipitates from the triple-transfected cells were analyzed by immunoblot using an antibody against the A<sub>2A</sub>R, a band of ~42 kDa, which corresponds to the A<sub>2A</sub>R, was observed (Fig. 1b, IP: GFP, lane 4, upper panel), and similarly, when these immunoprecipitates were analyzed by western blot using an antibody against the D<sub>2</sub>R, a band of ~90 kDa, which corresponds to the D<sub>2</sub>R, was observed (Fig. 1b, IP: GFP, lane 4, middle panel). Importantly, similar results were obtained when A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R were tagged with GFP<sup>2</sup> and analogous co-immunoprecipitation experiments were performed (Fig. 1c and d). Overall, these results suggest that mGlu<sub>5</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R are expressed in the same membrane domain and might form receptor heteromers.

#### Study of A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R, mGlu<sub>5</sub>R/A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R oligomers by BRET assays

Although the use of biochemical approaches to demonstrate receptor oligomerization has been widely used, it might have some disadvantages as the cellular structure is destroyed by detergent treatment. Thus, in order to assess if mGlu<sub>5</sub>R, A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R form oligomers in living cells, biophysical approaches were performed in cells transiently transfected with receptor constructs that carry appropriate fluorophore pairs in their C-terminus. Initially, by using a BRET

approach, a positive and saturable BRET signal for the transfer of energy between D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> in cells co-transfected with a constant concentration of the D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> and increasing concentrations of A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> was observed (Fig. 2a). As the control pair D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> and CD<sub>4</sub>R<sup>YFP</sup> led to a quasi-linear curve, the specificity of the saturation (hyperbolic) assay for the D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> pair could be established (Fig. 2a). Similarly, BRET<sup>2</sup> studies between A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup> and mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> and between D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> and mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> were performed and similar results obtained (data not shown). These results clearly corroborate previous studies about heterodimerization of A<sub>2A</sub>R with D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R with D<sub>2</sub>R (Ferre *et al.* 2002; Canals *et al.* 2003; Ciruela *et al.* 2004), and demonstrate the ability of D<sub>2</sub>R to heteromerize with mGlu<sub>5</sub>R. Interestingly, when the adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) and the GABA<sub>B2</sub> receptor (GABA<sub>B2</sub>R) were used as acceptors molecules (e.g. A<sub>1</sub>R<sup>YFP</sup> and GABA<sub>B2</sub>R<sup>YFP</sup>) in a BRET process with the D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> a considerable lower BRET efficiency was observed (Fig. 2b). These results suggest that receptors with none predicted physiological heteromer complex formation with D<sub>2L</sub>R (e.g. A<sub>1</sub>R and GABA<sub>B2</sub>R) might indeed be used as negative controls in BRET experiments.

To initially test the ability of these receptors to form heterotrimers, we performed a set of BRET competition experiments. Thus, HEK293 were transiently transfected with a constant ratio of A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup> and D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup> (2 μg and 1 μg, respectively), that was around the BRET<sub>50</sub> of this BRET pair, and increasing amounts of mGlu<sub>5</sub>R or CD<sub>4</sub>R (Fig. 2c). As shown in Fig. 2(b), under these conditions mGlu<sub>5</sub>R was able to reduce the BRET<sub>50</sub> efficiency of the A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>/D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup>-BRET pair in a biphasic mode. Conversely, increasing amounts of A<sub>2A</sub>R were able to reduce BRET<sub>50</sub> efficiency of the D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/mGlu<sub>5</sub>R<sup>YFP</sup>-BRET pair in a biphasic fashion (Fig. 2c). It is important to mention



**Fig. 2** BRET-based study of receptor heteromerization in HEK293 cells. BRET saturation experiments between D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> (●) or D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup> and CD<sub>4</sub>R<sup>YFP</sup> (△) (panel a). Both fluorescence and luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm equal expression of Rluc construct while monitoring the increase of YFP expression. mBU is the BRET ratio × 1000 (see Materials and methods). Error bars indicate SD of mean specific BRET ratio (mBU) values of five individual experiments grouped as a function of the amount of fluorescence of the acceptor. (b) Comparison of the

BRET<sub>max</sub> obtained for D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> (solid bar), D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/A<sub>1</sub>R<sup>YFP</sup> (white bar) and D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/GABA<sub>B2</sub>R<sup>YFP</sup> (gray bar) under similar experimental conditions. Results are expressed as a percentage of the BRET<sub>max</sub> obtained for the D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> pair. (c) Displacement study of a constant BRET ratio (~BRET<sub>50</sub>) of A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup>/D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup> pair by increasing amounts of mGlu<sub>5</sub>R (●) or CD<sub>4</sub>R (△) constructs. Also, a constant BRET ratio (~BRET<sub>50</sub>) of D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>/mGlu<sub>5</sub>R<sup>YFP</sup> pair was displaced by increasing amounts of A<sub>2A</sub>R (■).

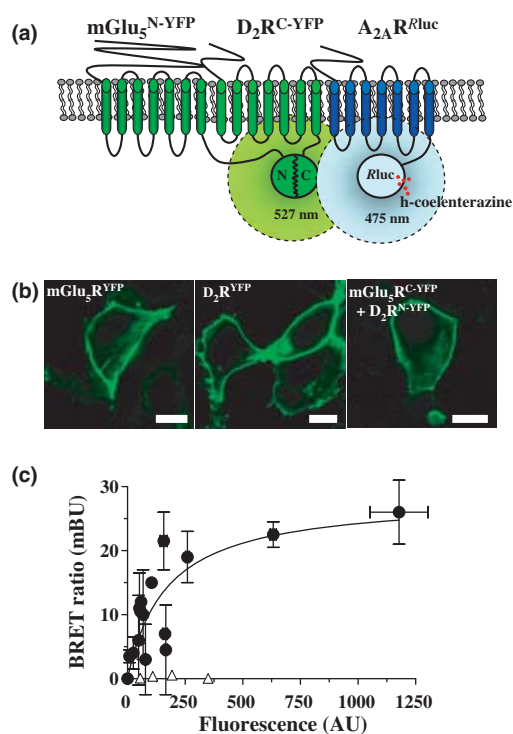


here that co-transfection of a fixed amount of the  $A_{2A}R^{Rluc}$ / $mGlu_5R^{YFP}$ -BRET pair with increasing amounts of  $D_2R$  produced a markedly alteration of the donor/acceptor (e.g.  $A_{2A}R^{Rluc}/mGlu_5R^{YFP}$ ) ratio, thus precluding BRET efficiencies comparison (data not shown). Finally, no competition of  $CD_4R$  with the  $A_{2A}R^{Rluc}/D_2R^{YFP}$ -BRET pair was observed (Fig. 2c). Overall, these results suggest that both  $mGlu_5R$  and  $A_{2A}R$  can either compete for the same  $D_2R$  binding site with two different affinities or two different binding sites with different affinities exists within the  $D_2R$  structure.

### A combined BRET/BiFC assay to determine the existence of higher-order $mGlu_5R/A_{2A}R/D_2R$ oligomers

As shown above, the existence of  $mGlu_5R/A_{2A}R/D_2R$  oligomers can be indirectly shown by using a combination of biochemical and biophysical techniques, but these approaches do not directly prove the existence of receptor complexes containing more than two protomers. For that purpose, we used a new experimental approach recently described (Gandia *et al.* 2008a) which consists in the combination of BRET and BiFC techniques (Fig. 3a). The BiFC assay, a protein fragment complementation method (Kerppola 2006a), is based on the ability to produce a fluorescent complex from non-fluorescent constituents if a protein-protein interaction occurs (Kerppola 2006b). To this end,  $mGlu_5R$  and  $D_2R$  fused at the C terminal with N-YFP and C-YFP fragments were generated and transfected into HEK cells. Cells single transfected with receptors containing either the C-YFP or N-YFP fragments in their C-terminal tail did not provide a positive fluorescent signal, (data not shown). As receptor heterodimerization caused YFP reconstitution, thus allowing fluorescence detection, we were able to visualize  $mGlu_5R/D_2R$  heterodimers in living cells (Fig. 3b). On the other hand, it has been previously shown that fluorescent protein fragments are able to complement with low efficiency, thus forming fluorescent complexes, even in the absence of a specific interaction (Kerppola 2006b). Therefore, some control experiments were designed to ensure that receptor heterodimerization was not driven by spontaneous YFP complementation. The most appropriate negative controls for this technique are fusion proteins that are expressed in the same subcellular compartment than the proteins under study but that are not able to interact. In this study we have used other unrelated GPCRs as negative controls, namely the  $GABA_{B1b}R$  and  $GABA_{B2}R$ . Under the same experimental conditions, we were not able to detect fluorescence complementation between the  $mGlu_5R$  or  $D_2R$  and either the  $GABA_{B1b}R$  or  $GABA_{B2}R$  (data not shown). Overall, these results convincingly show for the first time that  $mGlu_5R$  and  $D_2R$  do heterodimerize and that the  $mGlu_5R/D_2R$  heterodimers are located at the plasma membrane level of living cells (Fig. 3b, right panel).

Under the same experimental conditions, we performed a BRET saturation curve in cells co-transfected with a constant



**Fig. 3** Detection of  $mGlu_5R/A_{2A}R/D_2R$  heteromeric complexes by combined BRET/BiFC assays. (a) Schematic representation of the combined BRET/BiFC assay. BRET signal is triggered by the oxidation of h-coelenterazine by the  $Rluc$  fused to the C-terminal tail of the  $A_{2A}R^{Rluc}$  construct. This enzymatic reaction produces light emission at 475 nm, which might excite a proper fluorophore acceptor found in close proximity (within 10 nm). As acceptor we use the  $mGlu_5R/D_2R$  heterodimer-mediated complemented-YFP ( $mGlu_5R^{N-YFP}/D_2R^{C-YFP}$ ) that after excitation it emits at 527 nm. (b) Visualization of  $mGlu_5R/D_2R$  heterodimer by BiFC assays. HEK cells were transiently transfected with 5  $\mu$ g of the cDNA encoding  $mGlu_5R^{YFP}$ ,  $D_2R^{YFP}$  or  $mGlu_5R^{N-YFP}$  (5  $\mu$ g) plus  $D_2R^{C-YFP}$  (5  $\mu$ g) and processed for confocal microscopy imaging. Microscope observations were made with Olympus Fluoview 500 confocal scanning laser adapted to an inverted Olympus IX-70 microscope (Olympus America Inc., Melville, NY, USA). Scale bar: 10  $\mu$ m. (c) BRET saturation curve. BRET was measured in HEK cells co-expressing  $A_{2A}R^{Rluc}$  and  $mGlu_5R^{N-YFP} + D_2R^{C-YFP}$  (●) or  $A_{2A}R^{Rluc}$  and  $GABA_{B2}R^{YFP}$  (△) constructs. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid DNA for the YFP construct whereas the DNA for the  $Rluc$  construct was maintained constant. Both fluorescence and luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm equal expression of  $Rluc$  while monitoring the increase of YFP expression (see Materials and methods).

amount of the  $A_{2A}R^{Rluc}$  construct and increasing concentrations of the  $mGlu_5R^{N-YFP} + D_2R^{C-YFP}$  plasmids or  $GABA_{B2}R^{YFP}$ . A positive BRET signal for the transfer of energy between  $A_{2A}R^{Rluc}$  and  $mGlu_5R^{N-YFP} + D_2R^{C-YFP}$  was obtained (Fig. 3c). The BRET signal increased as a hyperbolic function of the heterodimer-mediated complemented YFP (assessed by the fluorescence emitted upon direct excitation

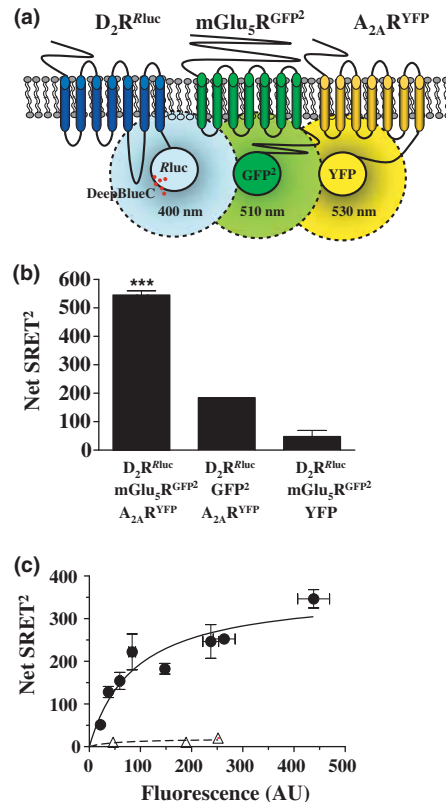
at 480 nm), thus strongly suggesting the formation of receptor oligomers containing more than two protomers, i.e. mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers (Fig. 3c).

### SRET in the study of higher-order mGlu<sub>5</sub>R/A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R oligomers

To pursue the direct detection of mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer formation, we implemented a new experimental approach developed by our research group (Carriba *et al.* 2008). This technique, named SRET, engage a BRET<sup>2</sup> method with a fluorescence resonance energy transfer (FRET) process (Carriba *et al.* 2008) (Fig. 4a). SRET is based on an adequate combination of donors and acceptors for BRET and for FRET and on the fact that different emission profiles result from the use of different *Rluc* substrates. Thus, DeepBlueC is used as a trigger agent for SRET instead of coelenterazine H. By the action of *Rluc*, oxidation of DeepBlueC is able to excite GFP<sup>2</sup>, which is a so called BRET<sup>2</sup> signal. While returning to the ground state, excited GFP<sup>2</sup> emits energy that excites YFP, providing a FRET signal. For a specified level of expression of the receptor coupled to the luciferase (*Rluc*), the highest SRET efficiency is observed when the FRET donor is relatively low whereas the expression of the FRET acceptor is relatively high. Therefore, we performed a set of preliminary experiments to establish the optimal concentrations of receptor constructs that need to be transfected to provide a maximum BRET<sup>2</sup> and FRET efficiency with the minimum photophysical cross-talks (Fig. S1) (Carriba *et al.* 2008; Ciruela 2008). Once the optimal conditions were found, we performed a single SRET measurement to characterize the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer. Thus, by using the following fusion protein ratio: D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> (2 μg), mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (4 μg) and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> (8 μg), we obtained a positive and specific SRET signal (Fig. 4b). Next, we performed a SRET saturation curve. Thus, HEK293 cells co-expressing a constant ratio of D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> (2 μg) plus mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (4 μg) and increasing amounts of A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> or CD<sub>4</sub>R<sup>YFP</sup> (Fig. 4c). Again, we could establish the specificity of the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer formation, as we obtained a saturable (hyperbolic) curve when compared to the negative control (Fig. 4c).

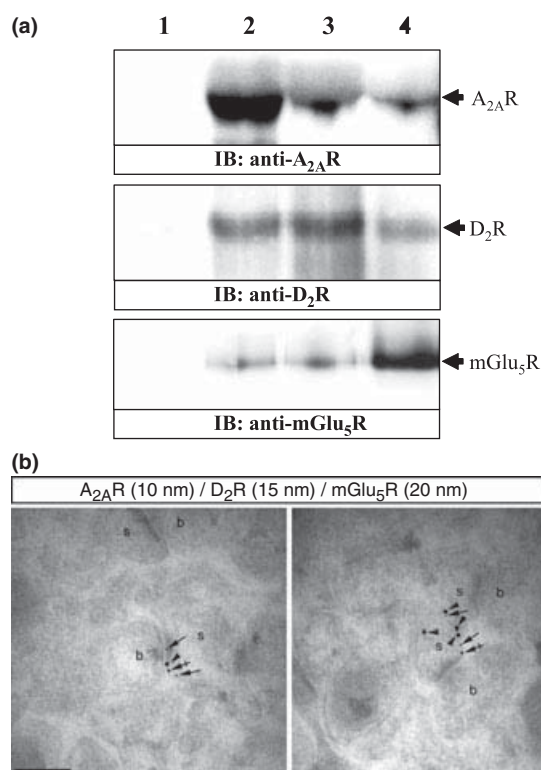
### mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R interactions in rat striatum

The demonstration of mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers in living cells provides for a morphological framework for the already known multiple functional interactions between these receptors in the brain (see introduction). To assess the physiological significance of the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R interaction co-immunoprecipitation experiments were performed using rat striatum homogenates. Using soluble extracts from rat striatum the anti-A<sub>2A</sub>R antibody was able to immunoprecipitate a band around 45 kDa which corresponds to the striatal A<sub>2A</sub>R, as expected (Fig. 5a). Interestingly, this antibody was able to immunoprecipitate the D<sub>2</sub>R



**Fig. 4** Detection of mGlu<sub>5</sub>R/A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R heteromeric complexes by SRET assays. Schematic representation of the SRET assay (panel a). The initial BRET signal is triggered by the oxidation of DeepBlueC by the *Rluc* fused to the C-terminal tail of the D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup> construct. This enzymatic reaction produces light emission at 400 nm, which might excite a proper fluorophore acceptor, for instance mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup>, if found in close proximity (within 10 nm). This fluorophore acceptor (mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup>) can engage now in a FRET process acting as a donor whose emission light at 510 nm can excite a suitable acceptor (A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>), thus ending in a net 530 nm fluorescence emission. (b) NetSRET was measured in HEK293 cells co-expressing D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>, mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup>. Fluorescence and luminescence of each sample were measured prior to every experiment to confirm similar expression levels. Data, expressed as net SRET are means ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test showed significant differences respect to both negative controls. \*\*\**p* < 0.001. (c) SRET saturation was measured in HEK293 cells co-expressing D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>, mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> (in a constant ratio 2 μg and 4 μg, respectively) with increasing amounts of the A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> (●) or CD<sub>4</sub>R<sup>YFP</sup> (△). Net SRET was detected for D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup>/mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup>/A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> compared with net SRET detected with cells expressing only D<sub>2L</sub>R<sup>Rluc</sup> plus mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup>.

(~90 kDa) and mGlu<sub>5</sub>R (~130 kDa) from the same extracts (Fig. 5a, lane 2). These bands did not appear when an irrelevant rabbit IgG was used for immunoprecipitation (Fig. 5a, lane 1), showing that the reaction was specific. Conversely, the anti-D<sub>2</sub>R antibody was able to immunoprecipitate the A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R and the anti-mGlu<sub>5</sub>R antibody the A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R, respectively (Fig. 5a).



**Fig. 5** Interaction of A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R in rat striatum. (a) Co-immunoprecipitation of A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R from rat striatum. Rat striatal membranes were solubilized and processed for immunoprecipitation using control rabbit IgG (5 μg/mL; lane 1), rabbit anti-A<sub>2A</sub>R polyclonal antibody (5 μg/mL; lane 2), rabbit anti-D<sub>2</sub>R polyclonal antibody (5 μg/mL; lane 3) and rabbit anti-mGlu<sub>5</sub>R polyclonal antibody (5 μg/mL; lane 4). Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using rabbit anti-A<sub>2A</sub>R whole serum (1/2000), rabbit anti-D<sub>2</sub>R whole serum (1/2000) or rabbit anti-mGlu<sub>5</sub>R polyclonal antibody (1 μg/mL) and HRP-conjugated anti-rabbit IgG TrueBlot™ (1/1000) as a secondary antibody. These blots are representative of three different experiments with similar qualitative results. (b) Sub-cellular distribution of A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R in rat striatum. Electron micrographs showing immunoreactivity for A<sub>2A</sub>R, D<sub>2</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R in rat striatum as revealed using a triple-labeling post-embedding immunogold technique. Immunoparticles for A<sub>2A</sub>R (10 nm size, arrows), D<sub>2</sub>R (15 nm size, crossed arrows) and mGlu<sub>5</sub>R (20 nm size, arrowheads) were detected along the extrasynaptic and perisynaptic plasma membrane of the same dendritic spine (s) establishing excitatory synaptic contact with axon terminals (b). Scale bar: 0.2 μm.

Overall, these results suggest that mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R do oligomerize in native tissue, namely striatum, and that this oligomerization might be physiologically relevant.

To provide the precise morphological evidence and to elucidate the subcellular localization of the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer in neurons of the rat striatum, we performed triple-labeling post-embedding immunogold techniques at electron microscopic level. Thus, we have showed here that mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R co-distributed in post-synaptic

structures along the extra-synaptic and peri-synaptic plasma membrane of spines, establishing asymmetrical, putative glutamatergic, synapses with axon terminals (Fig. 5b). This precise distribution of mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R in striatal neurons resembles that previously described for these receptors (Uchigashima *et al.* 2007; Ciruela *et al.* 2006a). Overall, this is the first direct anatomic evidence for mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R co-distribution in the same neuronal compartment and support the idea that the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer localized in the GABAergic striatopallidal neurons might play a key role in striatal function both in normal and pathological conditions.

## Discussion

A key aim of post-genomic biomedical research is to systematically catalog all molecules and their interactions in a living cell. Many fundamental cellular processes involve multiple interactions among proteins and other biomolecules, i.e. biomolecular interaction networks (Xia *et al.* 2004). Protein-protein physical interactions constitute an important group of biomolecular interaction networks (Xia *et al.* 2004), such as the neuronal horizontal molecular networks (Agnati *et al.* 2003; Bockaert *et al.* 2003; Franco *et al.* 2003). Horizontal molecular networks take place at the neuronal plasma membrane level, where specific GPCR interact and integrate the messages provided by a variety of neurotransmitters.

Immunodetection and co-immunoprecipitation assays are being used successfully to draw a map of molecular networks involving protein-protein interactions of cytosolic proteins. In contrast, these techniques have limitations when analyzing heptaspanning membrane receptors. In the early eighties, and based on indirect functional evidences, it was proposed that GPCR receptors could interact at the level of the neuronal plasma membrane. In the early nineties, electrophoretic mobility and co-immunoprecipitation assays gave the first indication of GPCR homomerization. More recently, several experimental approaches have been used in the study of the quaternary structure of GPCRs, revealing the existence of receptor homo- and heteromers (Milligan and Bouvier 2005). Among these approaches, fluorescence-based methods, as non-invasive techniques, have played a key role in the characterization of a large array of protein-protein interactions in general and in the study of GPCR oligomerization in particular (Gandia *et al.* 2008b). The use of the biophysical techniques BRET and FRET, allowed the demonstration of GPCR homodimerization and heterodimerization GPCRs in living cells (Bouvier 2001; Agnati *et al.* 2003; Franco *et al.* 2003). We and others have recently introduced a set of new techniques based on the combination of resonance energy transfer (RET)-based methods together with Bimolecular Fluorescence/Luminescence Complementation techniques (BiFC and BiLC, respectively) that has made possible to

detect GPCR heteromers constituted by more than two receptors (Dupre *et al.* 2006; Lopez-Gimenez *et al.* 2007; Carriba *et al.* 2008; Gandia *et al.* 2008a; Guo *et al.* 2008; Navarro *et al.* 2008; Vidi *et al.* 2008).

The existence of functional mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers in the GABAergic striatopallidal neuron has often been discussed in the literature, based on the high and selective co-expression of mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R in these particular cells (see introduction), on the demonstration of A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R heteromers (see introduction) and on the existence of strong multiple interactions between the three receptors (see below). However, the demonstration of their simultaneous physical interaction had not yet been reported. By using immunodetection and co-immunoprecipitation, BRET competition, BRET/BiFC and SRET techniques, this study provides clear evidence for the existence of the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers in living cells and in rat striatum. Co-immunodetection and co-immunoprecipitation experiments demonstrated that when co-expressed in the same cell or in native tissue, mGlu<sub>5</sub>R, D<sub>2</sub>R and A<sub>2A</sub>R are physically linked in the cell membrane. BRET competition experiments gave indirect evidence for the existence of mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomers, by demonstrating that co-expression of mGlu<sub>5</sub>R significantly modified the BRET signal of the heteromer formed by A<sub>2A</sub>R<sup>Rluc</sup> and D<sub>2</sub>R<sup>YFP</sup>. Also, the direct proof for mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomerization came from experiments with BRET/BiFC and SRET. Finally, our immunogold experiments clearly demonstrated the specific post-synaptic location of the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer in GABAergic striatopallidal neurons. However, it is important to mention here that apart of the assumed post-synaptic interaction describe here a putative pre-synaptic interaction for A<sub>2A</sub>R/mGlu<sub>5</sub>R and A<sub>2A</sub>R/D<sub>2</sub>R has been also showed (Rodrigues *et al.* 2005; Tozzi *et al.* 2007). To this regard we can not exclude the possibility that the mGlu<sub>5</sub>R/D<sub>2</sub>R/A<sub>2A</sub>R oligomer might also exists pre-synaptically, thus controlling the excitability and firing of medium spiny neurons. This is an issue that deserves more future work.

Strong functional antagonistic interactions between A<sub>2A</sub>R and D<sub>2</sub>R were first described and recently reviewed (Ferre *et al.* 2008) and, later on, antagonistic interactions between mGlu<sub>5</sub>R and D<sub>2</sub>R and synergistic interactions between A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R were also reported (Popoli *et al.* 2001; Ferre *et al.* 2002). In membrane preparations from rat striatum, stimulation of either A<sub>2A</sub>R or mGlu<sub>5</sub>R produces a decrease in the affinity of D<sub>2</sub>R for agonists and a decrease in D<sub>2</sub>R agonist-mediated motor activation (Ferre *et al.* 1991; Popoli *et al.* 2001). Interestingly, co-stimulation of A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R produces a synergistic antagonistic modulation of D<sub>2</sub>R ligand binding and function that is significantly stronger than the reduction induced by stimulation of either receptor alone (Popoli *et al.* 2001). Thus, co-administration of A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R agonists inhibits motor activation induced by D<sub>2</sub>R agonists (Popoli *et al.* 2001; Ferre *et al.* 2002). Also,

central A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R agonist co-administration counteracts the inhibitory effect that endogenous dopamine exerts on *c-fos* expression by tonically stimulating striatal D<sub>2</sub>R (Ferre *et al.* 2002). It was, therefore, hypothesized that the multiple mGlu<sub>5</sub>R-D<sub>2</sub>R-A<sub>2A</sub>R interactions could provide a new therapeutic approach for some neuropsychiatric disorders, such as Parkinson's disease (Popoli *et al.* 2001; Fuxe *et al.* 2003). In fact, A<sub>2A</sub>R antagonists are being shown to be clinically useful as anti-parkinsonian agents (Muller and Ferre 2007). Also, there is pre-clinical evidence for the efficacy of mGlu<sub>5</sub>R antagonists (Ossowska *et al.* 2001; Breyse *et al.* 2002) and, more importantly, for a synergistic effect of A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R antagonists in animal models of Parkinson's disease (Coccorello *et al.* 2004; Kachroo *et al.* 2005). Hyperactivity of the GABAergic striatopallidal neuron is a main pathophysiological mechanism responsible for hypokinesia in Parkinson's disease (Obeso *et al.* 2000). The reported synergistic anti-parkinsonian effect of A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R antagonists in animal models (Coccorello *et al.* 2004; Kachroo *et al.* 2005) suggests that the dopamine depletion-induced hyperactivity of striatopallidal neurons depends on a synergistic stimulatory endogenous tone of endogenous adenosine and glutamate on A<sub>2A</sub>R and mGlu<sub>5</sub>R, upon interruption of D<sub>2</sub>R signaling.

In summary, in the present study we provide biochemical evidence that supports the existence of mGlu<sub>5</sub>R-D<sub>2</sub>R-A<sub>2A</sub>R heteromers in living cells and strongly suggest their presence in the brain, in the GABAergic striatopallidal neurons, where they can provide important targets for the treatment of neuropsychiatric disorders.

## Acknowledgements

This work was supported by grants SAF2008-01462 and Consolider-Ingenio CSD2008-00005 from Ministerio de Ciencia e Innovación and by Sociedad Española de Farmacología and Laboratorios Almirall to FC. Also, supported by the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (PAI08-0174-6967) to RL and by the Intramural funds of the National Institute on Drug Abuse, NIH.

## Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** FRET for the mGlu<sub>5</sub>R<sup>GFP2</sup> and A<sub>2A</sub>R<sup>YFP</sup> pair in the presence of D<sub>2</sub>R<sup>Rluc</sup>.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

## References

Agnati L. F., Ferre S., Lluís C., Franco R. and Fuxe K. (2003) Molecular mechanisms and therapeutic implications of intramembrane

- receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons. *Pharmacol. Rev.* **55**, 509–550.
- Bjelke B., Goldstein M., Tinner B. *et al.* (1996) Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J. Chem. Neuroanat.* **12**, 37–50.
- Bockaert J., Marin P., Dumuis A. and Fagni L. (2003) The ‘magic tail’ of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* **546**, 65–72.
- Bouvier M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 274–286.
- Breyse N., Baunez C., Spooen W., Gasparini F. and Amalric M. (2002) Chronic but not acute treatment with a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist reverses the akinetic deficits in a rat model of parkinsonism. *J. Neurosci.* **22**, 5669–5678.
- Burgueno J., Enrich C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2003) Metabotropic glutamate type 1 $\alpha$  receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* **86**, 785–791.
- Cabello N., Remelli R., Canela L. *et al.* (2007) Actin-binding protein alpha-actinin-1 interacts with the metabotropic glutamate receptor type 5b and modulates the cell surface expression and function of the receptor. *J. Biol. Chem.* **282**, 12143–12153.
- Canals M., Marcellino D., Fanelli F. *et al.* (2003) Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **278**, 46741–46749.
- Carriba P., Navarro G., Ciruela F. *et al.* (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* **5**, 727–733.
- Ciruela F. (2008) Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 338–343.
- Ciruela F. and McIlhinney R. A. (1997) Differential internalisation of mGluR1 splice variants in response to agonist and phorbol esters in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* **418**, 83–86.
- Ciruela F., Burgueno J., Casado V. *et al.* (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Anal. Chem.* **76**, 5354–5363.
- Ciruela F., Casado V., Rodrigues R. J. *et al.* (2006a) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> receptor heteromers. *J. Neurosci.* **26**, 2080–2087.
- Ciruela F., Ferre S., Casado V., Cortes A., Cunha R. A., Lluís C. and Franco R. (2006b) Heterodimeric adenosine receptors: a device to regulate neurotransmitter release. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2427–2431.
- Coccorello R., Breyse N. and Amalric M. (2004) Simultaneous blockade of adenosine A<sub>2A</sub> and metabotropic glutamate mGlu5 receptors increase their efficacy in reversing Parkinsonian deficits in rats. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1451–1461.
- Dupre D. J., Robitaille M., Ethier N., Villeneuve L. R., Mamarbachi A. M. and Hebert T. E. (2006) Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *J. Biol. Chem.* **281**, 34561–34573.
- Ferre S., von Euler G., Johansson B., Fredholm B. B. and Fuxe K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A<sub>2</sub> receptors decreases the affinity of dopamine D<sub>2</sub> receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 7238–7241.
- Ferre S., Fredholm B. B., Morelli M., Popoli P. and Fuxe K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **20**, 482–487.
- Ferre S., Karcz-Kubicha M., Hope B. T. *et al.* (2002) Synergistic interaction between adenosine A<sub>2A</sub> and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 11940–11945.
- Ferre S., Ciruela F., Canals M. *et al.* (2004) Adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* **10**, 265–271.
- Ferre S., Agnati L. F., Ciruela F., Lluís C., Woods A. S., Fuxe K. and Franco R. (2007a) Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in ‘local modules’: the striatal spine module. *Brain Res. Rev.* **55**, 55–67.
- Ferre S., Ciruela F., Woods A. S., Lluís C. and Franco R. (2007b) Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* **30**, 440–446.
- Ferre S., Quiroz C., Woods A. S., Cunha R., Popoli P., Ciruela F., Lluís C., Franco R., Azdad K. and Schiffmann S. N. (2008) An update on adenosine A<sub>2A</sub>-dopamine D<sub>2</sub> receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1468–1474.
- Ferré S., Ciruela F., Woods A. *et al.* (2003) Glutamate mGluR<sub>5</sub>/adenosine A<sub>2A</sub>/dopamine D<sub>2</sub> receptor interactions in the striatum. Implications for drug therapy in neuro-psychiatric disorders and drug abuse. *Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents* **3**, 1–26.
- Franco R., Canals M., Marcellino D. *et al.* (2003) Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 238–243.
- Fredholm B. B., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N. and Linden J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527–552.
- Fuxe K., Agnati L. F., Jacobsen K. *et al.* (2003) Receptor heteromerization in adenosine A<sub>2A</sub> receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson’s disease. *Neurology* **61**, S19–S23.
- Gandia J., Galino J., Amaral O. B., Soriano A., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2008a) Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* **582**, 2979–2984.
- Gandia J., Lluís C., Ferre S., Franco R. and Ciruela F. (2008b) Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization. *BioEssays* **30**, 82–89.
- Gerfen C. R. (2004) Basal ganglia, in *The Rat Nervous System* (Paxinos G., ed.), pp. 445–508. Academic Press, Amsterdam.
- Guo W., Urizar E., Kralikova M., Mobarec J. C., Shi L., Filizola M. and Javitch J. A. (2008) Dopamine D<sub>2</sub> receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* **27**, 2293–2304.
- Hettinger B. D., Lee A., Linden J. and Rosin D. L. (2001) Ultrastructural localization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J. Comp. Neurol.* **431**, 331–346.
- Jansson A., Goldstein M., Tinner B., Zoli M., Meador-Woodruff J. H., Lew J. Y., Levey A. I., Watson S., Agnati L. F. and Fuxe K. (1999) On the distribution patterns of D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat. *Neuroscience* **89**, 473–489.
- Jordan M., Schallhorn A. and Wurm F. M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 596–601.
- Kachroo A., Orlando L. R., Grandy D. K., Chen J. F., Young A. B. and Schwarzschild M. A. (2005) Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A<sub>2A</sub> receptors in normal and parkinsonian mice. *J. Neurosci.* **25**, 10414–10419.

- Kerppola T. K. (2006a) Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **3**, 969–971.
- Kerppola T. K. (2006b) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat. Protoc.* **1**, 1278–1286.
- Levey A. I., Hersch S. M., Rye D. B., Sunahara R. K., Niznik H. B., Kitt C. A., Price D. L., Maggio R., Brann M. R. and Ciliax B. J. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 8861–8865.
- Lindvall O. and Bjorklund A. (1978) Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **19**, 1–23.
- Lopez-Gimenez J. F., Canals M., Pediani J. D. and Milligan G. (2007) The alpha1b-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1015–1029.
- Lujan R. and Ciruela F. (2001) Immunocytochemical localization of metabotropic glutamate receptor type 1 alpha and tubulin in rat brain. *Neuroreport* **12**, 1285–1291.
- Milligan G. and Bouvier M. (2005) Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *FEBS J.* **272**, 2914–2925.
- Missale C., Nash S. R., Robinson S. W., Jaber M. and Caron M. G. (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **78**, 189–225.
- Muller C. E. and Ferre S. (2007) Blocking striatal adenosine A2A receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent. Patents CNS Drug Discov.* **2**, 1–21.
- Narushima M., Uchigashima M., Hashimoto K., Watanabe M. and Kano M. (2006) Depolarization-induced suppression of inhibition mediated by endocannabinoids at synapses from fast-spiking interneurons to medium spiny neurons in the striatum. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 2246–2252.
- Navarro G., Carriba P., Gandia J., Ciruela F., Casado V., Cortes A., Mallol J., Canela E. I., Lluis C. and Franco R. (2008) 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* **8**, 1088–1097.
- Obeso J. A., Rodriguez-Oroz M. C., Rodriguez M., Lanciego J. L., Artieda J., Gonzalo N. and Olanow C. W. (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **23**, S8–S19.
- Ossowska K., Konieczny J., Wolfarth S., Wieronska J. and Pilc A. (2001) Blockade of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) produces antiparkinsonian-like effects in rats. *Neuropharmacology* **41**, 413–420.
- Paquet M. and Smith Y. (2003) Group I metabotropic glutamate receptors in the monkey striatum: subsynaptic association with glutamatergic and dopaminergic afferents. *J. Neurosci.* **23**, 7659–7669.
- Popoli P., Pezzola A., Torvinen M., Reggio R., Pintor A., Scarchilli L., Fuxe K. and Ferre S. (2001) The selective mGlu(5) receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D(2) receptors in the rat striatum: interactions with adenosine A(2a) receptors. *Neuropsychopharmacology* **25**, 505–513.
- Rodrigues R. J., Alfaro T. M., Rebola N., Oliveira C. R. and Cunha R. A. (2005) Co-localization and functional interaction between adenosine A(2A) and metabotropic group 5 receptors in glutamatergic nerve terminals of the rat striatum. *J. Neurochem.* **92**, 433–441.
- Rosin D. L., Robeva A., Woodard R. L., Guyenet P. G. and Linden J. (1998) Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **401**, 163–186.
- Sarrio S., Casado V., Escriche M., Ciruela F., Mallol J., Canela E. I., Lluis C. and Franco R. (2000) The heat shock cognate protein hsc73 assembles with A(1) adenosine receptors to form functional modules in the cell membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5164–5174.
- Schiffmann S. N., Jacobs O. and Vanderhaeghen J. J. (1991) Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J. Neurochem.* **57**, 1062–1067.
- Schiffmann S. N., Fisone G., Moresco R., Cunha R. A. and Ferre S. (2007) Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* **83**, 277–292.
- Schmidt U., Richter K., Berger A. B. and Lichter P. (2006) In vivo BiFC analysis of Y14 and NXF1 mRNA export complexes: preferential localization within and around SC35 domains. *J. Cell Biol.* **172**, 373–381.
- Tozzi A., Tschertner A., Belcastro V., Tantucci M., Costa C., Picconi B., Centonze D., Calabresi P. and Borsini F. (2007) Interaction of A2A adenosine and D2 dopamine receptors modulates corticostriatal glutamatergic transmission. *Neuropharmacology* **53**, 783–789.
- Uchigashima M., Narushima M., Fukaya M., Katona I., Kano M. and Watanabe M. (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J. Neurosci.* **27**, 3663–3676.
- Vidi P. A., Chen J., Irudayaraj J. M. and Watts V. J. (2008) Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett.* **582**, 3985–3990.
- Xia Y., Yu H., Jansen R., Seringhaus M., Baxter S., Greenbaum D., Zhao H. and Gerstein M. (2004) Analyzing cellular biochemistry in terms of molecular networks. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1051–1087.



## **ANEXO III**





ORIGINAL  
ARTICLEThe Parkinson's disease-associated GPR37  
receptor-mediated cytotoxicity is controlled by its  
intracellular cysteine-rich domain

Jorge Gandía,\* Víctor Fernández-Dueñas,\* Xavier Morató,\*  
Gianluigi Caltabiano,† Rosario González-Muñiz,‡ Leonardo Pardo,†  
Igor Stagljar§ and Francisco Ciruela\*

\*Unitat de Farmacologia, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de  
Medicina, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

†Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat  
Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

‡Instituto de Química Médica, CSIC, Madrid, Spain

§Department of Biochemistry and Department of Molecular Genetics, Donnelly Centre, University of  
Toronto, Toronto, Ontario, Canada

**Abstract**

GPR37, also known as parkin-associated endothelin-like receptor (Pael-R), is an orphan G protein-coupled receptor (GPCR) that aggregates intracellularly in a juvenile form of Parkinson's disease. However, little is known about the structure or function of this receptor. Here, in order to better understand the functioning of this receptor, we focused on the GPR37 C-terminal tail, in particular on a cysteine-enriched region. Thus, we aimed to reveal the role of these residues on receptor plasma membrane expression and function, and also whether the presence of this cysteine-rich domain is linked to the previously described receptor-mediated cytotoxicity. Interestingly, while the deletion of six cysteine residues within this

region did not affect receptor internalization it promoted GPR37 plasma membrane expression and signaling. Furthermore, the removal of the C-terminal cysteine-rich domain protected against GPR37-mediated apoptosis and cell death. Overall, we identified a GPR37 domain, namely the C-terminal tail cysteine-rich domain, which played a critical role in receptor cell surface expression, function and GPR37-mediated cytotoxicity. These results might contribute to better comprehend the pathophysiology (i.e. in Parkinson's disease) of this rather unknown member of the GPCR family.

**Keywords:** cell surface expression, cytotoxicity, GPR37, orphan receptor, Pael-R, Parkinson's disease.

*J. Neurochem.* (2013) **125**, 362–372.

Parkin-associated endothelin-like receptor (Pael-R), also called GPR37, is an orphan G protein-coupled receptor (GPCR) first cloned in 1997 from human brain (Marazziti *et al.* 1997). Within the brain, this receptor is particularly enriched in cerebellum (i.e. Purkinje cells), corpus callosum, medulla, putamen, caudate nucleus, substantia nigra and hippocampus (i.e. pyramidal and granule cells of the dentate gyrus) (Donohue *et al.* 1998; Marazziti *et al.* 1997; Takahashi and Imai 2003; Zeng *et al.* 1997). Interestingly, GPR37 has been identified as a parkin substrate (Imai *et al.* 2001; Takahashi and Imai 2003). Parkin is a protein-ubiquitin

Received September 19, 2012; revised manuscript received February 6, 2013; accepted February 6, 2013.

Address correspondence and reprint requests to Francisco Ciruela, Unitat de Farmacologia, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Facultat de Medicina, IDIBELL, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain.  
E-mail: fciruela@ub.edu

*Abbreviations used:* AC, adenylyl cyclase; ATF4, activating transcription factor 4; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ER, endoplasmic reticulum; GPCR, G protein-coupled receptor; HA, head activator; HRP, horseradish-peroxidase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; PD, Parkinson disease; SDS, sodium dodecyl sulfate; UPR, unfolded protein response.

ligase E3 involved in the ubiquitination and proteasome-mediated protein degradation and in the clearance of aggregated proteins (Dev *et al.* 2003). Therefore, parkin loss of function, such as in autosomal recessive juvenile Parkinson (Dev *et al.* 2003), prevents degradation of parkin substrates (i.e. GPR37) which results in their toxic accumulation (Shimura *et al.* 2000; Sriram *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2000). Indeed, GPR37 has been described to be up-regulated in the brains of autosomal recessive juvenile Parkinson patients (Imai *et al.* 2001). In addition, the presence of GPR37 in the core of Lewy bodies in Parkinson disease (PD) patients has been reported (Murakami *et al.* 2004), thus suggesting a role of GPR37 aggregates in PD pathology. Finally, viral-mediated GPR37 over-expression *in vivo* (i.e. in the substantia nigra) constitutes a good PD animal model because it results in progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons (Dusonchet *et al.* 2009; Low and Aebischer 2012).

Collectively, these results established a good correlation between the expression of this orphan receptor and PD. However, very little information exists regarding the functional and structural characteristics of this receptor. For instance, GPR37 has a significant sequence homology (40%) with the mammalian peptide activated class A GPCRs (i.e. endothelin-B receptor, bombesin-BB<sub>1</sub> and bombesin-BB<sub>2</sub> receptors; Marazziti *et al.* 1997, 1998), but agonists for these receptors (i.e. endothelin and bombesin) failed to activate GPR37 (Leng *et al.* 1999; Valdenaire *et al.* 1998; Zeng *et al.* 1997). However, it has been reported, not without some controversy (Dunham *et al.* 2009), that the neuropeptide head activator (HA), which is derived from the freshwater coelenterate Hydra, is a high-affinity ligand for GPR37 (Rezgaoui *et al.* 2006). Interestingly, in this last study it was reported that HA challenge induced GPR37-mediated intracellular Ca<sup>2+</sup> accumulation and activation of both Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin kinase and phosphoinositide-3-kinase (Rezgaoui *et al.* 2006). However, although some early publications suggested that HA is present in the human brain (Bodenmuller *et al.* 1980) and proposed a potential role in some brain tumors (Schaller *et al.* 1988), no equivalent neuropeptide has been identified in vertebrates, thus casting doubt on the existence of a human version of the HA neuropeptide. Therefore, the existence of HA neuropeptide in humans is still an open question, a fact that may be posed as an additional setback in the description of GPR37 biological functions.

In this study, we aimed to shed some light on GPR37 structure, function and toxicity, trying to elucidate some of the molecular determinants that mediate these processes and that may help to explain the mechanisms driving the toxic accumulation of the receptor. Interestingly, GPR37 possesses an inherent difficulty for folding, a fact that complicates its ectopic expression in living cells and plasma membrane trafficking (Takahashi and Imai 2003). Related to this, several studies have shown that different covalent post-

translational modifications of cysteine residues can have distinct effects on protein trafficking (Greaves and Chamberlain 2007) or on receptor coupling to G-proteins and thus in intracellular strength of signaling (Chini and Parenti 2009). Furthermore, it has also been shown that S-nitrosylation and further oxidation of critical cysteine residues can lead to protein misfolding, and that these misfolded proteins can form aggregates in many neurodegenerative diseases (Muchowski and Wacker 2005). Based on these data, we decided to explore the role of a cysteine-rich domain, located at the C-terminal tail of the GPR37, on receptor's trafficking, function and also its relationship with cytotoxicity.

## Materials and methods

### Plasmid constructs

The cDNA encoding the human GPR37 (Unigene ID: Hs.725956; Source BioScience, Nottingham, U.K.) was amplified and subcloned into the HindIII/EcoRI restriction sites of the pcDNA3 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using the iProof High-Fidelity DNA polymerase (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the following primers: FGPR37 (5'-CGCAAGCTTATGCGAGCCCCGG-3') and RGPR37 (5'-CGCGAATTCTCAGCAATGAGTCCG-3'). The same strategy was followed for generating the C-terminal mutants GPR37<sup>Δ563</sup> and GPR37<sup>Δ571</sup>, and by using the same FGPR37 primer and the following reverse primers: RA563 (5'-CCGAATTCTCACTCCATGAAGGCCCGAC-3') and RA571 (5'-CCGAATTCTCATTCTCACAGCAACAGCAGC-3'), respectively. For generating the C-terminal mutant GPR37<sup>Δ563-568</sup> we used the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions with the following primers: FA563-568 (5'-TCGGGCCTTCATGGAGGAGGAATGCATTGAGA-3') and RA563-568 (5'-TCTGAATGCATTCTCCTCCATGAAGGCCCGA-3').

### Antibodies

A rabbit anti-GPR37 polyclonal antibody was raised by immunizing rabbits with a glutathione S-transferase-fusion protein containing amino acids 27-265 of GPR37 (glutathione S-transferase-GPR37) and following the protocol described previously (Ciruela *et al.* 2004). The antibody was affinity purified and used at 1–2 µg/mL. Other primary antibodies used were rabbit anti-α-actinin polyclonal antibody (0.2 µg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-CREB2/ATF4 polyclonal antibody (Santa Cruz), goat anti-GRP78 polyclonal antibody (Santa Cruz) and mouse anti-α-tubulin monoclonal antibody (Sigma, St Louis, MO, USA). The secondary antibodies used were: horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/30000), HRP-conjugated rabbit anti-goat IgG (1/30000), HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1/10000) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) and AlexaFluor488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen).

### Cell culture, transfection and membrane preparation

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 5%

(v/v) fetal bovine serum at 37°C and in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. HEK293 cells growing in 20 cm<sup>2</sup> dishes or in 9 cm<sup>2</sup> wells (containing if necessary 18 mm coverslips) were transiently transfected with DNA encoding for the proteins specified in each case using TransFectin™ Lipid Reagent (Bio-Rad) and following the instructions provided by the manufacturer. The cells were harvested 48 h after transfection. Membrane suspensions from transfected HEK293 cells were obtained as described previously (Burgueno *et al.* 2003, 2004).

#### Gel electrophoresis and immunoblotting

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE) was performed using 7.5 or 10% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes using a semi-dry transfer system (Bio-Rad) and immunoblotted with the indicated antibody and then HRP-conjugated correspondent secondary antibody. The immunoreactive bands were developed using a chemiluminescent detection kit (Thermo Fisher Scientific) (Ciruela and McIlhinney 1997).

#### Immunocytochemistry and cell viability assay

Transiently transfected HEK293 cells growing on 18 mm diameter glass coverslips were fixed in 1% paraformaldehyde for 15 min, and washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the remaining free aldehyde groups. When necessary, cells were permeabilized with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min. Blocking was performed using buffer A containing 1% bovine serum albumin (buffer B). Cells were labeled for 1 h at 22°C with the rabbit anti-GPR37 polyclonal antibody (2 µg/mL), washed for 30 min in buffer B and stained with the AlexaFluor488-conjugated goat anti-rabbit (1 : 2000) for 1 h. In an optional final step, nuclei were labeled with a 100 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole solution (Invitrogen) for 15 min. Coverslips were rinsed for 30 min in buffer B, mounted with Vectashield immunofluorescence medium (Vector Laboratories, Orton Southgate, Peterborough, UK) and examined using a confocal microscope (Lujan and Ciruela 2001). To test antibody specificity, we omitted or replaced with buffer B the primary antibody. Under these conditions, no selective labeling was observed.

The cell viability was determined by means of vital staining. In brief, transiently transfected cells growing on 18-mm diameter glass coverslips were washed with PBS and stained with the Fixable Viability Dye eFluor® 780 (eBioscience, San Diego, CA, USA) during 30 min at 4°C, according to the manufacturer's instructions. Subsequently, cells were fixed and processed for immunocytochemistry as indicated above. Finally, cells were imaged at 780 and 520 nm upon excitation at 647 and 490 nm, respectively (Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### Biotinylation of cell surface proteins

Cell surface proteins were biotinylated as described previously (Ciruela *et al.* 1999, 2000). Briefly, HEK293 cells transiently transfected with each GPR37 construct were washed three times in borate buffer (10 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH 8.8; 150 mM NaCl) and incubated with 50 µg/mL Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific) in borate buffer for 5 min at 22°C. Cells were washed three times in borate buffer and again incubated with 50 µg/mL Sulfo-NHS-LC-Biotin in borate buffer for 10 min at 22°C, and

13 mM NH<sub>4</sub>Cl was added for 5 min to quench the remaining biotin. Cells were washed in PBS, disrupted with three 10 s strokes in a polytron and centrifuged at 16 000 g for 30 min. The pellet was solubilized in an ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris–HCl, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Sodium Deoxycholate) for 30 min and centrifuged at 16 000 g for 20 min. The supernatant was incubated with 80 µL streptavidin-agarose beads (Sigma-Aldrich) for 1 h with constant rotation at 4°C. The beads were washed three times with ice-cold lysis buffer and aspirated to dryness with a 28-gauge needle. Subsequently, 50 µL of SDS–PAGE sample buffer (8 M Urea, 2% SDS, 100 mM Dithiothreitol, 375 mM Tris, pH 6.8) were added to each sample. Proteins were dissociated by heating to 37°C for 2 h and resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gels and immunoblotted as described above.

#### Luciferase reporter gene assay

We used a dual luciferase reporter assay to indirectly detect variations of Ca<sup>2+</sup> levels in transiently transfected cell lines treated with different concentrations of compound. 24 h before transfection, cells were seeded at a density of 1 × 10<sup>6</sup> cells/well in 6-well dishes and transiently transfected. Cells were co-transfected with plasmids corresponding to three constructs as follows (per 6-well): 2 µg firefly luciferase-encoding experimental plasmid (pGL4-NFAT-RE/luc2p; Promega, Stockholm, Sweden), 2 µg of GPR37 expression vector and 50 ng *Renilla* luciferase-encoding internal control plasmid (phRG-B; Promega). Approximately 36 h post-transfection, cells were challenged with increasing concentrations of HA neuropeptide (Pyr-PPGGSKVILF-NH<sub>2</sub>; Genscript Corporation, Piscataway, NJ, USA) during 17 h. Subsequently, cells were harvested with passive lysis buffer (Promega) and the luciferase activity of cell extracts was determined using a luciferase assay system according to the manufacturer's protocol in a POLARstar Optima plate-reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany) using a 30-nm bandwidth excitation filter at 530 nm. Firefly luciferase was measured as firefly luciferase luminescence over a 15-s reaction period. The luciferase values were normalized against *Renilla* luciferase luminescence values.

#### cAMP determinations

The Promega cAMP-Glo™ assay was used to measure cAMP concentration in HEK293 cells. Transiently transfected cells were seeded overnight at 25,000 cells per well in a white 96-well plate treated with poly-D-lysine. Cells were washed once with non-supplemented DMEM and then incubated with non-supplemented DMEM in the presence of a phosphodiesterase inhibitor, zardaverine (50 µM). Cells were stimulated with forskolin (1 µM) and varying concentrations of HA neuropeptide for 15 min at 37 °C. Cells were lysed for 30 min and cAMP levels were determined following the manufacturer's guidelines with a POLARstar Optima plate reader (BMG LABTECH GmbH).

#### ER stress assessment and caspase 3 assay

Transiently transfected cells grown in 60 mm plates were incubated in the presence or the absence of 1 µM thapsigargin (Sigma) in non-supplemented DMEM for 6 h. Cells were harvested, washed once in PBS, solubilized using cold RIPA buffer for 30 min and centrifuged at 16 000 g for 30 min. Supernatants were collected and their

concentrations were determined using a BCA protein assay kit (Thermo). Thirty micrograms of each sample were processed with SDS-PAGE analysis for SDS-PAGE analysis.

Caspase 3 activity was determined using a fluorogenic substrate (Caspase 3 Substrate VII; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Transiently transfected cells were incubated for 2 h in non-supplemented DMEM, harvested and washed once with PBS. Cells were then solubilized for 1 h in 100  $\mu$ L of 1 $\times$  Caspase 3 Assay Buffer (20 mM HEPES-NaOH, pH7.2, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% CHAPS, 10% Sucrose, 1 $\times$  Protein Inhibitor) on ice and centrifuged at 16 000  $g$  for 15 min at 4°C. After the supernatants were isolated and their protein concentration quantified, 25  $\mu$ g of protein from the samples were loaded to the wells of a black 96-well plate, reaching a final volume of 50  $\mu$ L with water if necessary. Subsequently, all the wells were incubated for 6 h at 37°C with 50  $\mu$ L of 50  $\mu$ M Caspase 3 Substrate VII in 2 $\times$  Caspase 3 Assay Buffer, 20 mM Dithiothreitol. Fluorescence was read in a POLARstar Optima plate-reader (BMG LABTECH GmbH) exciting at 360 nm and reading at 530 nm.

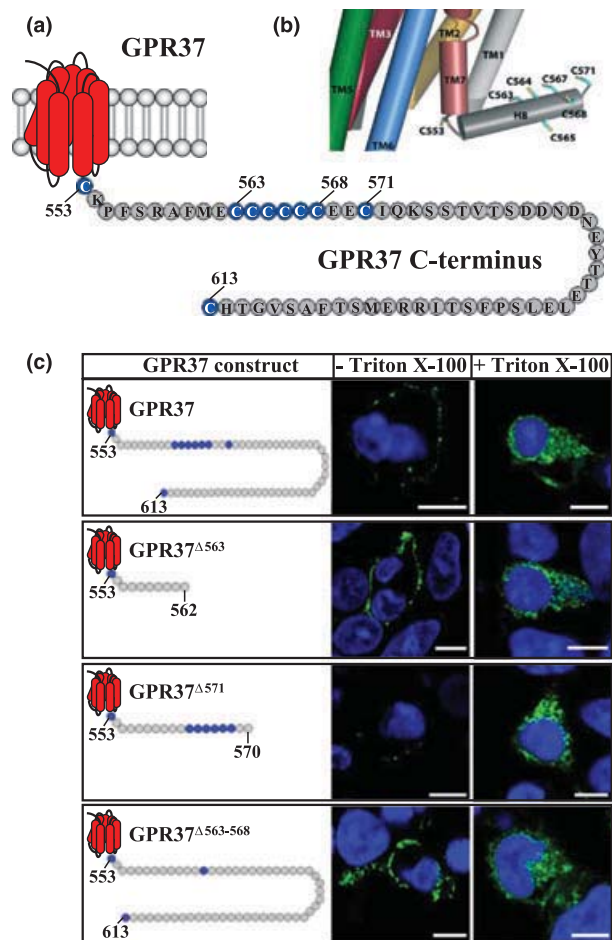
### Statistics

The number of samples ( $n$ ) in each experimental condition is indicated in the figure legends. When two experimental conditions were compared, statistical analysis was performed using an unpaired  $t$ -test. Otherwise, statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test. Statistical significance was set as  $p < 0.05$ .

## Results

### GPR37 cell surface expression is controlled by its C-terminal cysteine-rich domain

First, given the potential effect of cysteine residues on different aspects of receptor's biology, such as cell surface expression, we aimed to study the role of the C-terminal tail of GPR37 in plasma membrane targeting (Fig. 1a and b). Interestingly, apart from other occasional residues, a region with six-consecutive cysteine residues was found (amino acids 563–568). Therefore, we generated several GPR37 deleted mutants, one missing only the cysteine-rich domain (GPR37 $\Delta$ <sup>563–568</sup> construct), and also other two deleting almost the complete tail, with (GPR37 $\Delta$ <sup>571</sup>) or without (GPR37 $\Delta$ <sup>563</sup>) the cysteine-rich region (Fig. 1c). Subsequently, we studied receptor plasma membrane trafficking by means of two independent techniques: immunocytochemistry experiments and cell surface biotinylation assays. Interestingly, it could be observed that while in non-permeabilized cells GPR37 immunostaining showed a limited cell surface expression (Fig. 1c, –Triton X-100) in permeabilized cells a large amount of GPR37 was detected in intracellular compartments (Fig. 1c, +Triton X-100). A similar result was obtained when we deleted the last 40 amino-acids of the GPR37 C-terminal tail but the cysteine-rich domain was still present in the receptor (GPR37 $\Delta$ <sup>571</sup> construct) (Fig. 1c). However, when we deleted the last 48

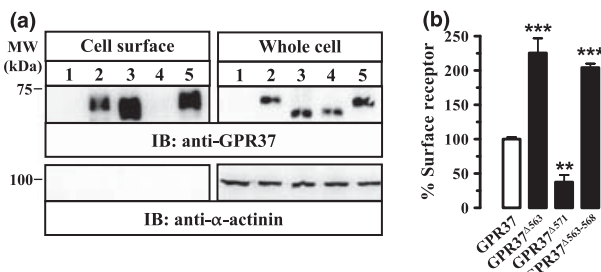


**Fig. 1** GPR37 and its C-terminal tail mutants. (a) Schematic representation of the C-terminal tail of the GPR37. The cysteine residues within GPR37 C-terminus are highlighted in blue and denoted by the residue number. (b) Molecular model of the intracellular part of GPR37 (UniProt accession no. O15354), constructed from the crystal structure of the adenosine A<sub>2A</sub> receptor (PDB accession no. 2YDO) [Lebon *et al.* (2011)]. The model shows that Cys553 is within the linker connecting TM7 and H8, whereas the amino acids comprised between Cys563 and Cys571 are part of H8. The other amino acids of the C-tail, from Ile572 to Cys613, were not modeled. (c) Immunocytochemical detection of GPR37 constructs. HEK293 cells grown on glass coverslips were transiently transfected with cDNA encoding GPR37, GPR37 $\Delta$ <sup>563</sup>, GPR37 $\Delta$ <sup>571</sup> and GPR37 $\Delta$ <sup>563–568</sup> and processed for immunocytochemistry using a rabbit anti-GPR37 antibody (2  $\mu$ g/mL). The bound primary antibody was detected by means of an AlexaFluor488-conjugated goat anti-rabbit (1 : 2000). Nuclei were stained with DAPI. Finally, cells were analyzed by confocal microscopy to detect GPR37 (green) and nuclei (blue). The scale bar represents 10  $\mu$ m.

amino-acids of the GPR37 C-terminal tail, thus losing the cysteine-rich domain (i.e. GPR37 $\Delta$ <sup>563</sup> construct), the receptor showed a robust plasma membrane transport compared with the full-length GPR37 (Fig. 1c, –Triton X-100). In addition, the deletion of only the six cysteine residues from the GPR37 C-terminal tail (GPR37 $\Delta$ <sup>563–568</sup> construct) also promoted

receptor cell surface expression (Fig. 1c, –Triton X-100), thus suggesting that the presence of this cysteine-rich domain within the C-terminal tail of the receptor precluded its plasma membrane trafficking.

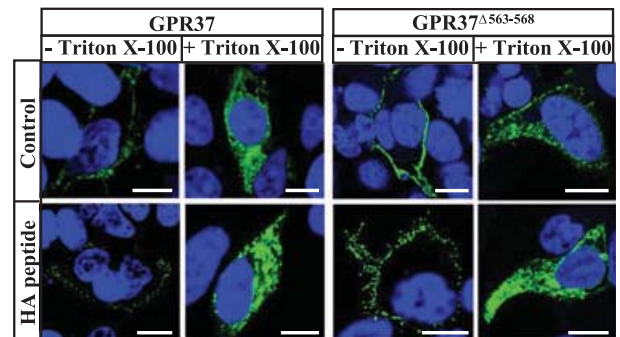
Next, to better test the hypothesis that the GPR37 cysteine-rich domain played a critical role on receptor's plasma membrane expression we performed cell surface biotinylation assays. We isolated GPR37 present in the plasma membrane using a membrane impermeant biotin ester, followed by streptavidin–agarose affinity purification of membrane proteins. As shown in Fig. 2, the proportional amount of GPR37 constructs missing the cysteine-rich domain (i.e. GPR37<sup>Δ563</sup> and GPR37<sup>Δ563-568</sup>), which was present at the cell surface of transfected cells, was approximately twice that of the full-length GPR37 (Fig. 2b). However, under the same experimental conditions when the cysteine-rich domain containing GPR37<sup>Δ571</sup> construct was tested, a marked reduction of cell surface expression was observed (Fig. 2b). Importantly, the assay was validated by detecting  $\alpha$ -actinin, a cytoskeletal marker, which could not be detected in the streptavidin isolates, indicating that the biotin ester did not penetrate the cell membrane (Fig. 2a, lower panel). Overall, these results, which are in concordance with our immunocytochemistry experiments, supported the hypothesis that the GPR37 cysteine-rich domain participates in the receptor's plasma membrane trafficking.



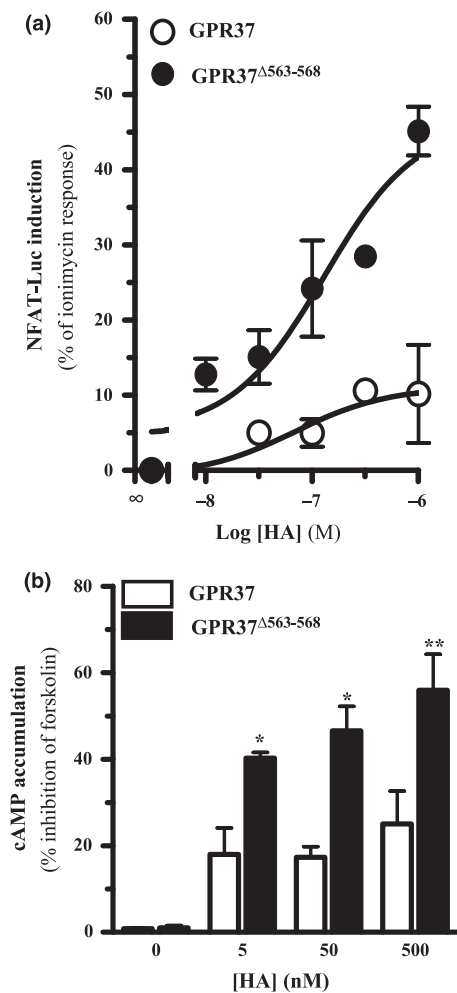
**Fig. 2** Cell surface immunodetection of GPR37 constructs. (a) HEK293 cells were transiently transfected with pcDNA3 (lane 1), GPR37 (lane 2), GPR37<sup>Δ563</sup> (lane 3), GPR37<sup>Δ571</sup> (lane 4) and GPR37<sup>Δ563-568</sup> (lane 5). Labeling of cell surface proteins was performed as described in Material and methods. Accordingly, crude cell extracts (whole cell) and biotinylated proteins (cell surface) were analyzed by SDS–PAGE and immunoblotted using a rabbit anti-GPR37 antibody (1  $\mu$ g/mL) or a rabbit anti-actinin antibody (0.2  $\mu$ g/mL) as a control to rule out the labeling of cytoplasmic proteins. Immunoreactive bands were detected as described in Materials and methods. (b) Quantification of cell surface expression of GPR37 constructs. Ratios between cell surface and whole cell receptor expression for each GPR37 construct were calculated and normalized assigning the 100% to the wild-type GPR37 construct. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Asterisk indicates data significantly different from the wild-type GPR37 construct: \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison *post hoc* test.

### Functional consequences of GPR37 cysteine-rich domain deletion

Once determined the role of the GPR37 cysteine-rich domain in receptor's plasma membrane trafficking, we aimed to test whether the HA neuropeptide was in our hands able to activate GPR37 and if the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain affected receptor functionality. Noteworthy, for the subsequent experiments only the GPR37<sup>Δ563-568</sup> mutant was used, because cell surface expression did not differ from that obtained with the mutant lacking the complete C-terminal tail. Furthermore, it was the less-truncated form of the receptor and thus it would potentially affect in lesser extent GPR37 functioning. Firstly, we measured the ability of the HA neuropeptide to induce receptor internalization, a phenomenon that has been previously shown (Rezgaoui *et al.* 2006). To this end, transiently transfected HEK293 cells with GPR37 or GPR37<sup>Δ563-568</sup> were challenged with the HA neuropeptide and the receptor distribution analyzed by immunocytochemistry both in permeabilized and non-permeabilized cells (Fig. 3). Interestingly, HA treatment induced a clustering of both GPR37 and GPR37<sup>Δ563-568</sup> at the plasma membrane, as shown by its pronounced punctuated distribution in non-permeabilized cells (Fig. 3, –Triton X-100). In addition, HA treatment induced a translocation of both receptor constructs into the cytoplasm, as shown by the increased presence of intracellular aggregates in permeabilized cells (Fig. 3, +Triton X-100). Overall, these results demonstrated that the receptor's cysteine-rich domain did not affect the HA-mediated GPR37 cell surface clustering and internalization. Next, we analyzed receptor functionality by measuring GPR37-mediated changes in intracellular calcium after HA stimulation. To this end, transiently transfected cells



**Fig. 3** HA-mediated GPR37 internalization. HEK293 cells grown on glass coverslips were transiently transfected with cDNA encoding GPR37 and GPR37<sup>Δ563-568</sup>, treated with vehicle (control) or with 1  $\mu$ M HA (HA peptide) for 60 min and processed for immunocytochemistry using a rabbit anti-GPR37 antibody (2  $\mu$ g/mL). The bound primary antibody was detected by means of an AlexaFluor488-conjugated goat anti-rabbit (1 : 2000). Nuclei were stained with DAPI. Finally, cells were analyzed by confocal microscopy to detect GPR37 (green) and nuclei (blue). The scale bar represents 10  $\mu$ m.



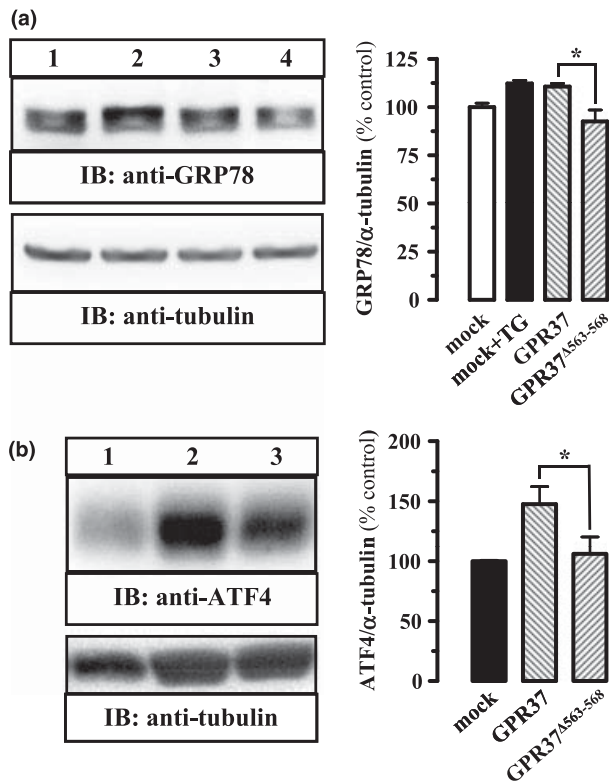
**Fig. 4** Functionality of GPR37 constructs. (a) Receptor-dependent changes in cytoplasmic calcium levels were measured using a luminescence-based method. A dose-response curve was obtained for HEK293 cells transfected with GPR37 or GPR37<sup>Δ563-568</sup> using the neuropeptide head-activator (HA) as an agonist. The results were represented as a percentage of the cellular response produced by 1  $\mu$ M ionomycin. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (b) Receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase was assessed for GPR37 and GPR37<sup>Δ563-568</sup>. Transfected cells with each form of the receptor were challenged with 1  $\mu$ M forskolin and different concentrations of the neuropeptide HA. Subsequently, cAMP concentration was determined using the Promega cAMP-Glo™ assay. The decrease in cAMP production is represented as a percentage of the response elicited by forskolin alone. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Asterisk indicates data significantly different from the wild-type GPR37 construct: \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison *post hoc* test.

with GPR37 or GPR37<sup>Δ563-568</sup> plus the reporter vector pGL4-NFAT-RE/luc2p were stimulated with increasing concentrations of the HA neuropeptide (Fig. 4a). Interestingly, a careful analysis of GPR37 and GPR37<sup>Δ563-568</sup> dose-

response curves for HA showed that while the EC<sub>50</sub> remained within the same range (69  $\pm$  25 nM and 129  $\pm$  54 nM, respectively) the maximum response was significantly different (11  $\pm$  3% and 46  $\pm$  5%, respectively) (Fig. 4a). It is important to mention here that control mock-transfected cells showed no intracellular Ca<sup>2+</sup> accumulations upon HA challenge (data not shown). Overall, these results indicated that the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain promoted receptor-mediated intracellular calcium accumulation. Finally, we also evaluated the effects of the HA neuropeptide on another signal transduction pathway, namely the generation of cAMP by means of the adenylyl cyclase (AC) enzyme. Thus, we tested whether HA challenge induced GPR37-mediated AC inhibition in cells transiently transfected with GPR37 upon incubation with forskolin and increasing concentrations of HA neuropeptide (Fig. 4b). Interestingly, as it happened with the GPR37-mediated intracellular calcium accumulation, the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain promoted receptor-mediated AC inhibition (Fig. 4b). In addition, under the same experimental conditions the HA neuropeptide was unable to inhibit forskolin-mediated AC activation in control mock-transfected cells (data not shown). Collectively, the obtained data indicated that the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain promoted receptor signal transduction, a phenomenon that might be consequence of either the enhanced GPR37 cell surface expression or the better G-protein coupling.

#### Role of the cysteine-rich domain in GPR37-induced ER stress

It has been demonstrated that intracellular accumulation of GPR37 in dopaminergic neurons leads to endoplasmic reticulum (ER) stress (Imai *et al.* 2001; Kitao *et al.* 2007). Therefore, as the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain facilitated receptor plasma membrane trafficking, we aimed to test the role of this domain in GPR37-induced ER stress. To this end, we analyzed the effect of GPR37 on the expression of the ER-resident folding assistant GRP78. The GRP78 chaperone is a master regulator for ER stress (Lee 2005) and in fact it has been shown to be up-regulated upon ER stress (Yang *et al.* 2003). Accordingly, we transiently transfected HEK293 cells with GPR37 and GPR37<sup>Δ563-568</sup>, and the expression of GRP78 was assessed by immunoblotting. As expected, GRP78 expression was enhanced after treatment with the sarcoendoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPases inhibitor, thapsigargin (Fig. 5a, lane 2) (Chen *et al.* 2000). Also, cells transfected with GPR37 showed a significant increment of GRP78 (110  $\pm$  1.7%,  $p$  < 0.05) when compared with mock transfected cells, thus suggesting that GPR37 expression promoted GRP78 up-regulation. However, cells transfected with GPR37<sup>Δ563-568</sup> did not show an increased GRP78 expression, which was indeed significantly different from that observed in GPR37 transfected cells (Fig. 5a). Overall, these results



**Fig. 5** GPR37 expression and ER stress. (a) Effect of GPR37 expression on GRP78. HEK293 cells were transiently transfected with an empty vector (mock, lane 1), GPR37 (lane 3) and GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> (lane 4). Mock transfected cells were treated with 1  $\mu$ M thapsigargin (TG) during 6 h as a control of GRP78 induced expression (lane 2). Cell lysates were obtained, analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using a goat anti-GRP78 antibody (1  $\mu$ g/mL) or a mouse anti- $\alpha$ -tubulin (0.2  $\mu$ g/mL) to control protein loading in the gel. (b) Effect of GPR37 expression on ATF4. HEK293 cells were transiently transfected with an empty vector (mock, lane 1), GPR37 (lane 2) and GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> (lane 3) and incubated with 1  $\mu$ M thapsigargin for 6 h. Cell lysates were obtained, analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using a rabbit anti-ATF4 antibody (1  $\mu$ g/mL) or a mouse anti- $\alpha$ -tubulin (0.2  $\mu$ g/mL) to control protein loading in the gel. Immunoreactive bands were detected as described in *Materials and methods* section. Ratios between GRP78 and ATF4 and  $\alpha$ -tubulin were calculated and normalized, assigning the 100% to the mock (right panels). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Asterisk indicates the significant difference of compared data: \* $p$  < 0.05 by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison *post hoc* test.

supported the hypothesis that the GPR37 cysteine-rich domain was involved in the receptor-mediated induction of GRP78 expression.

Upon ER stress, GRP78 is released by ER transmembrane signal transducers and leads the activation of UPR signaling pathways (Lee 2005). An unfolded protein response (UPR) downstream effector is the activating transcription factor 4 (ATF4), whose translation is increased upon ER stress

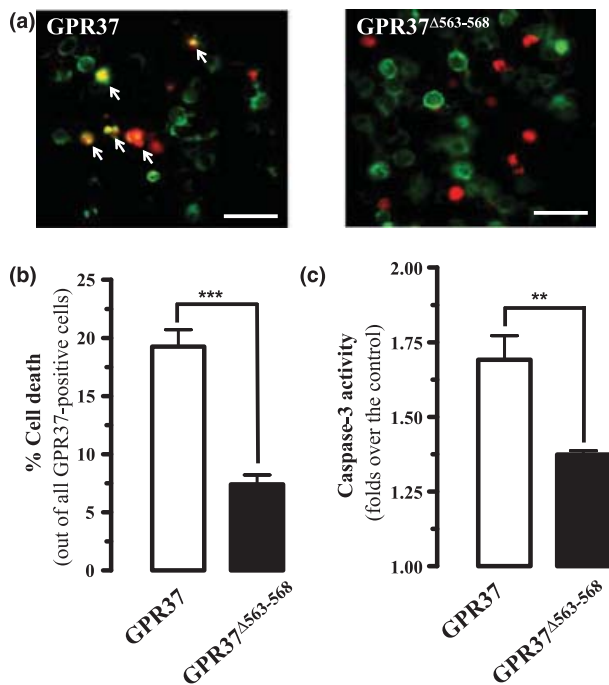
(Harding *et al.* 2000). Accordingly, we aimed to test whether ATF4 expression was altered by GPR37. Therefore, we transiently transfected HEK293 cells with GPR37 and the expression of ATF4 was assessed by immunoblotting. GPR37-transfected cells showed a significant increment of ATF4 expression ( $147 \pm 14\%$ ,  $p < 0.05$ ) when compared with mock-transfected cells (Fig. 5b), thus suggesting that GPR37 expression promoted ATF4 up-regulation. Conversely, under the same experimental conditions, cells transfected with GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> did not show a significant increase of ATF4, and its expression was significantly different from that observed in GPR37 transfected cells (Fig. 5b). These results supported the notion that the GPR37 cysteine-rich domain participated in receptor-mediated induction of ATF4 expression. Collectively, our data indicated that GPR37 expression induced GRP78 up-regulation and UPR signaling activation, a phenomenon precluded when the GPR37 cysteine-rich domain was absent.

#### Involvement of the cysteine-rich domain in GPR37-mediated cytotoxicity

Finally, given that GPR37 expression induced GRP78 expression and that it regulates ER stress-signaling pathways (i.e. ATF4 expression) leading to UPR survival and apoptosis responses (Szegezdi *et al.* 2006), we aimed to study the involvement of the cysteine-rich domain in receptor-mediated cytotoxicity. To this end, we initially assessed the effect of GPR37 on cell viability with a fixable vital dye in our immunocytochemistry experiments to detect cellular damage (Fig. 6a). Importantly, we were able to monitor positive cells for both markers (i.e. cellular death and receptor expression) and to quantify the extent of GPR37-positive cell death (Fig. 6b). Interestingly, we observed that the expression of both GPR37 or GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> led to significantly different levels of cell survival ( $19.2 \pm 4.3\%$  and  $7.4 \pm 2.4\%$ , respectively) thus suggesting that GPR37-mediated cell damage was dependent on the cysteine-rich domain (Fig. 6b).

In addition to the cell viability test, we also studied specific effects in the apoptotic pathway determining caspase 3 activity upon GPR37 or GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> expression. To this end, a fluorogenic substrate of caspase 3 was used to determine the activity of this cysteine-aspartic acid protease in lysates of cells transfected with each receptor form. The resulting fluorescence was normalized to a control sample from cells transfected with an empty vector. Interestingly, we observed that, as in the cell viability experiment, cells transfected with the wild-type GPR37 significantly showed more caspase 3 activity when compared with cells expressing GPR37 <sup>$\Delta$ 563-568</sup> ( $1.7 \pm 0.2$ -folds and  $1.3 \pm 0.03$ -folds, respectively), thus indicating that GPR37-mediated apoptosis is somehow dependent on the cysteine-rich domain (Fig. 6c). Collectively, these results demonstrated the important role of the GPR37 cysteine-rich domain in mediating the cytotoxic effects associated with receptor expression.





**Fig. 6** Effect of GPR37 expression on cell survival. (a) Microscope images show cells expressing GPR37 or GPR37<sup>Δ563-568</sup> (green) and cells that have entered the death process (red). Cells that are positive for both conditions are highlighted with an arrow. The scale bar represents 50  $\mu$ m. (b) Under these conditions, the subpopulation of dead GPR37-expressing cells were quantified for each construct and represented as a percentage of all transfected cells. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. Asterisk indicates data significantly different from the wild-type GPR37 construct: \*\*\* $p < 0.001$  by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison *post hoc* test. (c) The activity of caspase 3 was also determined from cells transfected with either GPR37 or GPR37<sup>Δ563-568</sup>. Cell lysates were obtained and equal amounts of protein from each sample were incubated in the presence of a fluorogenic substrate for caspase 3. The fluorescence generated was measured and normalized to lysates from cells transfected with an empty vector. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Asterisk indicates data significantly different from the wild-type GPR37 construct: \*\* $p < 0.01$  by ANOVA with Student–Newman–Keuls multiple comparison *post hoc* test.

## Discussion

Neurodegenerative diseases are characterized by the progressive loss of neurons, a phenomenon largely associated to ER and oxidative stress (Forman *et al.* 2003). Thus, a large body of studies has shown that ER stress-induced apoptosis is implicated in numerous human diseases, including diabetes and neurodegenerative diseases (Szegezdi *et al.* 2006). The build up of unfolded/misfolded proteins activates adaptive responses in cells, the UPR, that protect them from the toxic rise of these proteins (Rao and Bredesen 2004). However, a gradual overtime accumulation of unfolded/misfolded

proteins, together with an UPR failure, will finally promote not only cellular stress responses related to the ER but also the induction of specific death pathways (i.e. apoptosis) to remove the stressed cells (Kaufman 2002; Rao and Bredesen 2004). In such way, it has been described that the intracellular accumulation of GPR37 leads to ER stress, which ultimately triggers the activation of apoptotic pathways (e.g. activation of caspase 3) both in neurons and in stable cell lines (Rao and Bredesen 2004). Accordingly, a role of GPR37 aggregates in PD has been suggested (Kitao *et al.* 2007; Omura *et al.* 2006). It would then seem likely that the aggregation of GPR37 due to ineffective receptor folding would favor the presence of ubiquitinated protein deposits in the neuronal cytoplasm (i.e. Lewy bodies), thus prompting the loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta that occurs in PD (Murakami *et al.* 2004). However, despite this possible role of GPR37 in the pathology – i.e. mediating cell death upon receptor aggregation – very little is known about this orphan receptor and the molecular determinants driving its intracellular accumulation. Hence, in the present study, we focused on a cysteine-rich domain located at the C-terminal tail of the receptor as a possible cornerstone explaining the expression, function, ER-induced stress and cytotoxicity of the receptor.

First of all, we performed several mutations at the C-terminal tail of the receptor by deleting different cysteine residues-containing fragments and started examining whether they affected the cell surface expression of the receptor. As previously shown (Imai *et al.* 2001; Murakami *et al.* 2004), a large amount of the wild-type receptor was found in intracellular compartments. However, when deleting the cysteine-rich domain located between the residues 563 and 568, a robust increase in plasma membrane expression was detected (in both GPR37<sup>Δ563</sup> and GPR37<sup>Δ563-568</sup>). These results pointed out to a crucial role of this domain on receptor trafficking, although they diverge from those previously reported where the deletion of the whole GPR37 C-terminal tail prevented cell surface expression (Cookson 2005). Yet, the works differ in several experimental approaches, for instance the number of amino acid residues deleted, the technique used to determine the surface expression and other general methodologies (e.g. transfecting agent, vector where the constructs were subcloned, etc.). Nevertheless, we decided to next assess whether the mutations affected receptor's internalization and functionality, because it would seem likely that a change on signal transduction pathways should be observed due to the effect of the cysteine-rich domain on receptor expression at the cell surface. Interestingly, when the receptor was challenged with the HA neuropeptide it could be observed that the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain produced both an increase in Ca<sup>2+</sup> mobilization and in inhibition of cAMP accumulation. However, the receptor's cysteine-rich domain did not affect the HA-mediated GPR37 cell surface clustering and internalization. These results are consistent with those proposing that

the HA neuropeptide is an agonist of GPR37 that activates and induces GPR37 internalization in a pertussis toxin sensitive manner (Dunham *et al.* 2009; Imai *et al.* 2001; Rezgaoui *et al.* 2006). Overall, the functional experiments were in line with the immunocytochemistry, internalization and cell surface biotinylation assays, indicating that the studied cysteine-rich domain was important to retain the receptor at the cytoplasm, and as a consequence it was also responsible of regulating its membrane G-protein coupled signaling.

Next, based on the relevance of this cysteine-rich domain on receptor's trafficking and function, and because of the relationship of cytoplasmatic GPR37 aggregates with low survival rates in transfected cells (Dunham *et al.* 2009), we investigated whether this cysteine-rich region could constitute a molecular determinant of GPR37-mediated ER stress and cytotoxicity upon receptor expression. To this end, we first studied GPR37-mediated UPR triggering in cells transfected with the wild-type and the mutated receptor in which the cysteine-rich domain was deleted. Interestingly, the deletion of the GPR37 cysteine-rich domain efficiently reduced the receptor-mediated GRP78 up-regulation and UPR signaling activation, thus pointing out to a prominent role of this GPR37 domain in mediating ER stress. Also, the role of the GPR37 cysteine-rich domain on cell viability and also on caspase 3 pathway activation was analyzed. Interestingly, we effectively found that GPR37 over-expression in living cells induced cell death, as described previously (Rezgaoui *et al.* 2006). It is important to mention that dying cells expressing GPR37 showed features of both necrosis and apoptosis, which would suggest the concurrence of different pathways leading to the same physiological state. In addition, we also demonstrated that this GPR37-mediated cytotoxicity was significantly reduced when the cysteine-rich domain was removed. This is a particularly important finding because it revealed for the first time the importance of this GPR37 discrete amino acid sequence in the biology of this rather unknown receptor. Thus, the GPR37 cysteine-rich domain not only participated in the control of receptor plasma membrane trafficking and the concomitant receptor-mediated signal transduction, but it also was involved in ER stress and the cytotoxic effects associated to receptor expression. However, it remains to be determined what signals might control the subcellular distribution and function of GPR37 through modification of its cysteine-rich domain.

The ectopic expression of GPR37 may end in the formation of toxic receptor aggregates and ER stress, as mentioned above. In such situation, transfected cells trigger the protective UPR in an attempt to contain the deleterious effects of GPR37 intracellular accumulation. The UPR constitutes a concerted cellular response mediated by three ER transmembrane receptors: protein kinase R-like ER kinase, inositol-requiring enzyme 1, and ATF6. Under normal conditions, all three ER stress receptors are kept inactive

through their direct interaction with the ER chaperone, GRP78. However, when an unfolded/misfolded protein accumulates (i.e. GPR37), GRP78 dissociates from the three receptors, leading to their activation and triggering the activation of UPR signaling pathways (Rezgaoui *et al.* 2006). Interestingly, UPR is a pro-survival response intended to reduce the accumulation of unfolded proteins from the ER (Kitao *et al.* 2007; Omura *et al.* 2006). However, under persistent protein aggregation and prolonged ER stress, as it could happen upon GPR37 over-expression, the UPR will activate unique pathways switching the pro-survival response to a pro-apoptotic effect (Szegezdi *et al.* 2006). These pathways implicate the increased translation of ATF4 (Schroder and Kaufman 2005) and the concomitant induction of the transcription factor C/EBP homologous protein, which play a key role in switching UPR from pro-survival to pro-death signaling (Schroder and Kaufman 2005). Indeed, in our hands the ectopic expression of GPR37 in HEK293 cells induced ATF4 up-regulation, a phenomenon that was abolished when the GPR37 cysteine-rich domain was deleted. As a result, it could be postulated that the cysteine-rich region within the C-terminal tail of the GPR37 constitutes a receptor folding sensor, and thus either the absence or the blockade of this check point would facilitate receptor folding, trafficking and abolish its toxic accumulation. Interestingly, it has been reported that GPR37 is able to interact with other GPCRs, for instance the dopamine D<sub>2</sub> receptor (D<sub>2</sub>R), and that this interaction facilitates GPR37 cell surface expression (Harding *et al.* 2000). Indeed, GPCR heterodimerization often modulates receptor trafficking (Schroder and Kaufman 2005), thus it might be feasible that the negative effect of GPR37 cysteine-rich domain not only on receptor plasma membrane expression and signaling but also on mediating cytotoxic effects could be precluded by interacting (i.e. heterodimerize) with appropriate receptor partners (i.e. D<sub>2</sub>R). Overall, GPR37 heteromerization should be also contemplated as a way to attain proper receptor cell surface expression and function, and to diminish GPR37-mediated cytotoxicity.

In conclusion, the results obtained here point out to the following possible mechanistic scenario: while newly synthesized GPR37 is folded in the ER before being targeted to the plasma membrane, the misfolded GPR37 translocates across the ER membrane into the cytoplasm and is degraded through a parkin-dependent ubiquitin-proteasome pathway. However, when a dysregulation of this cellular control system occurs the aggregation of misfolded GPR37 takes place, triggering pro-death pathways, a process in which the cysteine-rich domain located at the C-terminal tail of the receptor might play a pivotal role. Interestingly, our results might be important to understand the pathogenesis associated to the accumulation of this expression-dependent misfolding receptor and ultimately to comprehend its relationship with PD.

## Acknowledgements

This work was supported by grants SAF2011-24779 and Consolider-Ingenio CSD2008-00005 from Ministerio de Ciencia e Innovación and ICREA Academia-2010 from the Catalan Institution for Research and Advanced Studies to FC. Also, JG, VF-D and FC belong to the “Neuropharmacology and Pain” accredited research group (Generalitat de Catalunya, 2009 SGR 232). We want to thank Dr Cristina Muñoz-Pinedo (Cell Death Regulation group, IDIBELL) for kindly providing the anti-GRP78 and anti-ATF4. We also thank Esther Castaño, Eva Julià, and Benjamín Torrejón, from the Scientific and Technical Services (SCT)-Bellvitge Campus of the University of Barcelona for the technical assistance.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bodenmuller H., Schaller H. C. and Darai G. (1980) Human hypothalamus and intestine contain a hydra-neuropeptide. *Neurosci. Lett.* **16**, 71–74.
- Burgueno J., Enrich C., Canela E. I., Mallol J., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2003) Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions. *J. Neurochem.* **86**, 785–791.
- Burgueno J., Canela E. I., Mallol J., Lluís C., Franco R. and Ciruela F. (2004) Mutual regulation between metabotropic glutamate type 1alpha receptor and caveolin proteins: from traffick to constitutive activity. *Exp. Cell Res.* **300**, 23–34.
- Chen L. Y., Chiang A. S., Hung J. J., Hung H. I. and Lai Y. K. (2000) Thapsigargin-induced grp78 expression is mediated by the increase of cytosolic free calcium in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell. Biochem.* **78**, 404–416.
- Chini B. and Parenti M. (2009) G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J. Mol. Endocrinol.* **42**, 371–379.
- Ciruela F. and McIlhinney R. A. (1997) Differential internalisation of mGluR1 splice variants in response to agonist and phorbol esters in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* **418**, 83–86.
- Ciruela F., Soloviev M. M. and McIlhinney R. A. (1999) Cell surface expression of the metabotropic glutamate receptor type 1alpha is regulated by the C-terminal tail. *FEBS Lett.* **448**, 91–94.
- Ciruela F., Soloviev M. M., Chan W. Y. and McIlhinney R. A. (2000) Homer-1c/Ves1-IL modulates the cell surface targeting of metabotropic glutamate receptor type 1alpha: evidence for an anchoring function. *Mol. Cell. Neurosci.* **15**, 36–50.
- Ciruela F., Burgueno J., Casado V. *et al.* (2004) Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope–epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal. Chem.* **76**, 5354–5363.
- Cookson M. R. (2005) The biochemistry of Parkinson’s disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 29–52.
- Dev K. K., van der Putten H., Sommer B. and Rovelli G. (2003) Part I: Parkin-associated proteins and Parkinson’s disease. *Neuropharmacology* **45**, 1–13.
- Donohue P. J., Shapira H., Mantey S. A., Hampton L. L., Jensen R. T. and Battey J. F. (1998) A human gene encodes a putative G protein-coupled receptor highly expressed in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **54**, 152–160.
- Dunham J. H., Meyer R. C., Garcia E. L. and Hall R. A. (2009) GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions. *Biochemistry* **48**, 10286–10297.
- Dusonchet J., Bensadoun J. C., Schneider B. L. and Aebischer P. (2009) Targeted overexpression of the parkin substrate Pael-R in the nigrostriatal system of adult rats to model Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* **35**, 32–41.
- Forman M. S., Lee V. M. and Trojanowski J. Q. (2003) ‘Unfolding’ pathways in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* **26**, 407–410.
- Greaves J. and Chamberlain L. H. (2007) Palmitoylation-dependent protein sorting. *J. Cell Biol.* **176**, 249–254.
- Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M. and Ron D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* **6**, 1099–1108.
- Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y. and Takahashi R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891–902.
- Kaufman R. J. (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 1389–1398.
- Kitao Y., Imai Y., Ozawa K., *et al.* (2007) Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 50–60.
- Lebon G., Warne T., Edwards P. C., Bennett K., Langmead C. J., Leslie A. G. and Tate C. G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521–525.
- Lee A. S. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* **35**, 373–381.
- Leng N., Gu G., Simerly R. B. and Spindel E. R. (1999) Molecular cloning and characterization of two putative G protein-coupled receptors which are highly expressed in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **69**, 73–83.
- Low K. and Aebischer P. (2012) Use of viral vectors to create animal models for Parkinson’s disease. *Neurobiol. Dis.* **48**, 189–201.
- Lujan R. and Ciruela F. (2001) Immunocytochemical localization of metabotropic glutamate receptor type 1 alpha and tubulin in rat brain. *NeuroReport* **12**, 1285–1291.
- Marazziti D., Golini E., Gallo A., Lombardi M. S., Matteoni R. and Tocchini-Valentini G. P. (1997) Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G-protein-coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library. *Genomics* **45**, 68–77.
- Marazziti D., Gallo A., Golini E., Matteoni R. and Tocchini-Valentini G. P. (1998) Molecular cloning and chromosomal localization of the mouse Gpr37 gene encoding an orphan G-protein-coupled peptide receptor expressed in brain and testis. *Genomics* **53**, 315–324.
- Muchowski P. J. and Wacker J. L. (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 11–22.
- Murakami T., Shoji M., Imai Y., Inoue H., Kawarabayashi T., Matsubara E., Harigaya Y., Sasaki A., Takahashi R. and Abe K. (2004) Pael-R is accumulated in Lewy bodies of Parkinson’s disease. *Ann. Neurol.* **55**, 439–442.
- Omura T., Kaneko M., Okuma Y., *et al.* (2006) A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin. *J. Neurochem.* **99**, 1456–1469.
- Rao R. V. and Bredesen D. E. (2004) Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 653–662.

- Rezgaoui M., Susens U., Ignatov A., Gelderblom M., Glassmeier G., Franke I., Urny J., Imai Y., Takahashi R. and Schaller H. C. (2006) The neuropeptide head activator is a high-affinity ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR37. *J. Cell Sci.* **119**, 542–549.
- Schaller H. C., Schilling E., Theilmann L., Bodenmuller H. and Sachsenheimer W. (1988) Elevated levels of head activator in human brain tumors and in serum of patients with brain and other neurally derived tumors. *J. Neurooncol.* **6**, 251–258.
- Schroder M. and Kaufman R. J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739–789.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S., *et al.* (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302–305.
- Sriram S. R., Li X., Ko H. S., Chung K. K., Wong E., Lim K. L., Dawson V. L. and Dawson T. M. (2005) Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2571–2586.
- Szegezdi E., Logue S. E., Gorman A. M. and Samali A. (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **7**, 880–885.
- Takahashi R. and Imai Y. (2003) Pael receptor, endoplasmic reticulum stress, and Parkinson's disease. *J. Neurol.* **250**(Suppl 3), III25–III29.
- Valdenaire O., Giller T., Breu V., Ardati A., Schweizer A. and Richards J. G. (1998) A new family of orphan G protein-coupled receptors predominantly expressed in the brain. *FEBS Lett.* **424**, 193–196.
- Yang Y., Nishimura I., Imai Y., Takahashi R. and Lu B. (2003) Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron* **37**, 911–924.
- Zeng Z., Su K., Kyaw H. and Li Y. (1997) A novel endothelin receptor type-B-like gene enriched in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 559–567.
- Zhang Y., Gao J., Chung K. K., Huang H., Dawson V. L. and Dawson T. M. (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13354–13359.

