



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Implicación estructural y funcional de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G de relevancia en adicción, enfermedad de Huntington y cáncer

Mireia Medrano Moya

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

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

**IMPLICACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DE HETERÓMEROS DE RECEPTORES ACOPLADOS A
PROTEÍNAS G DE RELEVANCIA EN ADICCIÓN,
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON Y CÁNCER**

Memoria presentada por la Licenciada en Biología
MIREIA MEDRANO MOYA
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Biomedicina del
Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Universidad de Barcelona

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por
Mireia Medrano Moya bajo la dirección de la Dra. Josefa Mallol Montero y el Dr. Vicent
Casadó Burillo

Dra. Josefa Mallol Montero

Dr. Vicent Casadó Burillo

Mireia Medrano Moya

Barcelona, Abril de 2017



1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Receptores acoplados a proteína G	11
1.1.1. Descubrimiento de los GPCRs	12
1.1.2. Clasificación y estructura de los GPCRs	13
1.1.3. Activación y vías de señalización	15
1.1.4. Actividad constitutiva y ligandos de los GPCRs	17
1.1.5. Regulación de la actividad de los GPCRs	19
1.2. Oligomerización de GPCRs	21
1.2.1. Interfases entre GPCRs y dominios de interacción con las proteínas G	23
1.2.2. Alostereismo en GPCRs	24
1.2.3. Técnicas para la identificación de oligómeros de GPCRs	25
1.2.4. Relevancia funcional de la oligomerización de GPCRs	30
1.3. Sistema orexinérgico	31
1.3.1. Orexinas y receptores de orexina	32
1.3.2. Papel fisiológico de los receptores de orexina	34
1.4. Ingesta y homeostasis energética	36
1.4.1. Orexinas y comportamientos asociados con la ingesta	37
1.4.2. Grelina; péptido y receptores	39
1.4.3. Leptina; hormona y receptores	41
1.5. Comportamientos relacionados con recompensas a drogas de abuso	44
1.5.1. Adicción a psicoestimulantes	46
1.5.2. Receptores sigma	49
1.5.3. Respuesta al estrés	50
1.5.4. CRF; péptidos y receptores	52
1.5.5. Efecto del estrés sobre la adicción a drogas de abuso	53
1.6. Sistema cannabinoide	56
1.6.1. Receptores de cannabinoides y ligandos	58
1.6.1.1. Receptores CB ₁ y CB ₂	59
1.6.1.2. Receptores GPR55 y TRPV1	60
1.6.1.3. Ligandos cannabinoides	62
1.6.2. Mecanismos de acción de los receptores cannabinoides	64
1.6.3. Heterómeros de receptores cannabinoides	66
1.6.4. Papel fisiológico	66
1.6.4.1. Memoria y aprendizaje	67
1.6.4.2. Ansiedad	67
1.6.4.3. Depresión	68
1.6.4.4. Adicción	69
1.6.4.5. Apetito y comportamientos relacionados con la ingesta	70
1.6.4.6. Dolor	70
1.6.4.7. Neuroprotección	71
1.7. Enfermedad de Huntington	72
1.7.1. Etiología y síntomas	72
1.7.2. Huntingtina y mecanismos de neurodegeneración	74
1.7.3. Ganglios basales; poblaciones neuronales afectadas	76

1.7.4.Cannabinoides en la enfermedad de Huntington	78
1.7.5.Receptores de adenosina	79
1.7.6.Neuroprotección mediada por los receptores A_{2A} y CB_1	81
1.8. Cannabinoides en cáncer	82
1.8.1.Cáncer de mama; implicación de GPR55	84
2. OBJETIVOS	89
3. RESULTADOS	95
3.1. Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons	97
3.2. Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF_2 , orexin receptor OX_1 and CRF_2 - OX_1 heteroreceptor complex	123
3.3. Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} - cannabinoid CB_1 receptor heteromers in the dorsal striatum	145
3.4. Targeting CB_2 -GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling	161
4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	179
5. CONCLUSIONES	195
6. ANEXOS	199
6.1. Anexo 1	199
6.2. Anexo 2	199
7. BIBLIOGRAFÍA	203

ABREVIATURAS

Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AC	Adenilato Ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AgRP	<i>Agouti-Related Peptide</i>
ARC	Núcleo arcuato
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BiLC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>
BRET	<i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CART	<i>Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript</i>
CBD	Cannabidiol
CeA	Núcleo de la amígdala central
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CPP	<i>Conditioned Place Preference</i>
CREB	<i>cAMP Response Element Binding protein</i>
CRF	Hormona liberadora de corticotropina
CRF-BP	<i>CRF-Binding Protein</i>
DAG	Diacilglicerol
DMH	Núcleo dorsomedial hipotalámico
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinases</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GABA	Ácido γ -amino butírico
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa
GASP	<i>GPCR-Associated Sorting Protein</i>
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
GMP	Guanosina monofosfato
GP	Globo pálido
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GRK	Quinasas de GPCRs
GTP	Guanosina trifosfato
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPA	Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
icv	Intracerebroventricular
IP3	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
JAK	<i>Janus-Activated Kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>

LC	<i>Locus coeruleus</i>
LH	Hipotálamo lateral
LHA	Área hipotalámica lateral
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MEK	<i>MAPK/ERK Kinase</i>
MSNs	<i>Medium Spiny Neurons</i>
MSP	<i>Membrane Scaffold Protein</i>
NAc	Núcleo accumbens
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Neuronas del tracto solitario
PDE	Fosfodiesterasa
PFA	Área perifornical
PFC	Corteza prefrontal
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PLC β	Fosfolipasa C β
PLD	Fosfolipasa D
POMC	Pro-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
RE	Retículo Endoplasmático
RET	<i>Resonance Energy Transfer</i>
RGS	Reguladores de la señalización de proteínas G
Rluc	<i>Renilla reniformis luciferase</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SNC	Sistema nervioso central
SNC	<i>Substantia Nigra pars compacta</i>
SNr	<i>Substantia Nigra pars reticulata</i>
STAT	<i>Signal-transducer and activator of transcription</i>
TM	Transmembrana
TMN	Núcleo tuberomamilar
VMN	Núcleo ventromedial
VTA	Área tegmental ventral
WT	<i>Wild Type</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescence Protein</i>



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Receptores acoplados a proteína G

El cuerpo humano es un sistema finamente regulado mediante interacciones entre billones de células, que permanecen en constante comunicación para adaptarse a nuevas situaciones. Cada célula, pues, requiere de diversos mecanismos de transmisión de la información a través de la membrana plasmática. Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) son proteínas que constituyen la mayor familia de receptores de membrana en el genoma humano; son moléculas versátiles responsables de la transducción de señales al ser activadas por un amplio abanico de ligandos estructuralmente diversos y ser capaces de modular la actividad de distintas vías de señalización intracelular de manera específica (Figura 1). En 1983 se publicó la estructura primaria del primer GPCR identificado, el receptor de rodopsina (Hargrave et al., 1983; Nathans and Hogness, 1983); desde entonces, se ha avanzado notablemente en el conocimiento tanto estructural como funcional de los GPCRs, siendo el punto de inflexión la secuenciación del genoma humano (Fredriksson et al., 2003). Hoy en día se conocen más de 800 genes que codifican para diferentes miembros de la familia, receptores que unen y son activados por gran variedad de estímulos incluyendo fotones, iones, moléculas del olor, el sabor, hormonas y neurotransmisores (Marinissen and Gutkind, 2001). Sus funciones son extremadamente diversas ya que regulan múltiples procesos fisiológicos tales como funciones neurológicas, inmunes, cardiovasculares, endocrinas y metabólicas, poniendo de manifiesto las importantes implicaciones de dichos receptores como potenciales dianas terapéuticas. De hecho, aproximadamente la mitad de los medicamentos comercializados en la actualidad ejercen sus efectos a través de GPCRs (Schlyer and Horuk, 2006).

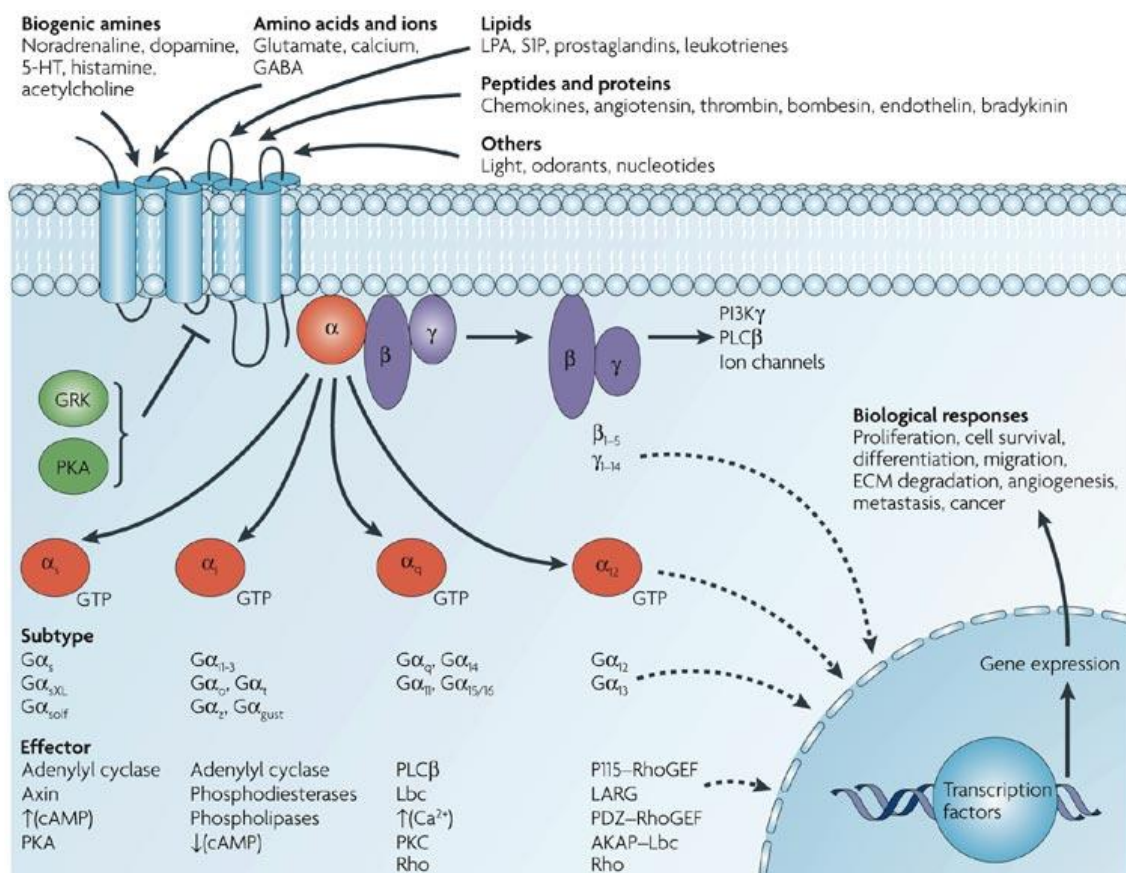


Figura 1. Ligandos endógenos y vías de señalización celular mediadas por GPCRs, responsables de la diversidad de sus funciones biológicas. (Extraído de Dorsam y Gutkind, 2007)

En los últimos años, se ha demostrado una mayor complejidad en la regulación y la señalización de estos receptores de la que se había revelado inicialmente, incluyendo la señalización mediante vías independientes de proteína G, la existencia de ligandos funcionalmente selectivos al promover eventos de señalización específicos a través de un mismo receptor (ligandos *biased*) y la aceptada capacidad de oligomerización.

1.1.1. Descubrimiento de los GPCRs

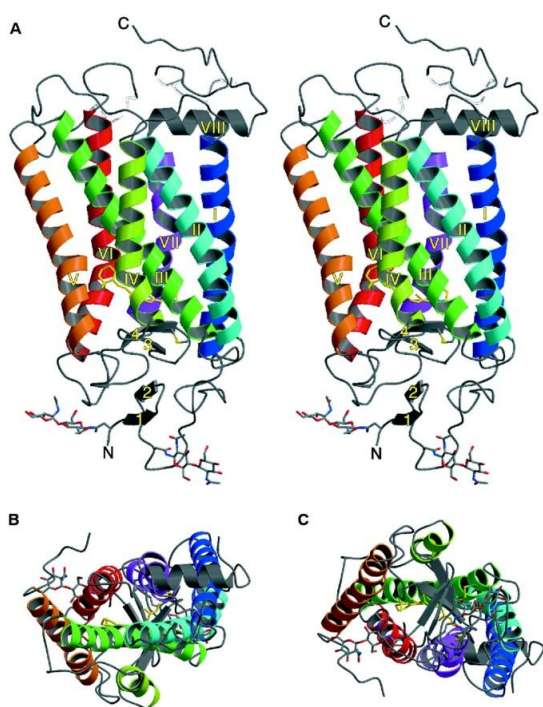


Figura 2. Representación de la estructura cristalina del receptor de rodopsina. (A) Vista paralela al plano de la membrana. Vista en el plano de la membrana des del lado citoplasmático (B) y des del lado intradiscal (C). (Extraído de Palczewski et al., 2000)

En 1851, Heinrich Müller fue el primero en describir la coloración roja de los bastones, células fotorreceptoras de la retina responsables de la visión en condiciones de baja luminosidad, aunque fueron Franz Boll y Wilhelm Kühne entre 1876 y 1877 quienes describieron el efecto de la luz en el pigmento rodopsina (Palczewski, 2014). Sin embargo, no fue hasta principios de la década de 1980 cuando se describió la secuencia aminoacídica completa de la rodopsina bovina y se realizó el primer modelo bidimensional, que mostró una estructura formada por un dominio N-terminal extracelular, una secuencia helicoidal que atravesaba la membrana en siete ocasiones y un dominio C-terminal intracelular (Palczewski, 2014). La rodopsina es pues, un receptor de tipo GPCR activado por fotones de luz e implicado en la transmisión de la señal visual. Palczewski y colaboradores publicaron la estructura cristalina de alta resolución de la rodopsina en condiciones de oscuridad, es decir, en condiciones de no activación, constituyendo el primer modelo

tridimensional experimental de un GPCR (Palczewski et al., 2000) (Figura 2). Desde su descubrimiento hasta hoy, la rodopsina ha servido de prototipo estructural para el estudio de diferentes miembros de la superfamilia de GPCRs, aunque presenta una particularidad que lo distingue de la gran mayoría de miembros, como es la unión covalente de un cromóforo no proteico, el derivado de la vitamina A 11-cis-retinal, a la proteína (opsina). La activación del receptor mediante fotones de luz estimula una proteína G que a su vez induce la activación de una fosfodiesterasa que convierte guanosina monofosfato cíclico (cGMP) a GMP.

Ya en 1970, Lefkowitz fue capaz de aislar el receptor β_2 -adrenérgico de la membrana mediante el uso de isótopos radiactivos unidos a la hormona adrenocorticotropa (Lefkowitz et al., 1970a, 1970b). El posterior aislamiento del gen que codificaba para dicho receptor procuró la primera evidencia de una plataforma estructural común en la superfamilia de GPCRs (Dixon et al., 1986; Dohlman et al., 1987). Veinte años separan el

descubrimiento del receptor β_2 -adrenérgico de su cristalización por parte de los grupos de Kobilka y Schertler (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007) (Figura 3), que sella definitivamente la homología estructural con el receptor de membrana rodopsina postulada años atrás.

Actualmente se han resuelto más de cien estructuras de GPCRs, la mayoría de los cuales pertenecen a la clase A de GPCRs, entre los que encontramos el receptor de adenosina A_{2A} , el receptor de histamina H_1 , el receptor de dopamina D_3 , el receptor de orexina OX_2 y el receptor cannabinoide CB_1 entre otros, y también a las clases B, C y F, como el receptor de corticotropina CRF_1 o los receptores metabotrópicos glutamatérgicos $mGlu1$ y $mGlu5$ (Borroto-Escuela et al, consultar www.gpcr-hetnet.com y sus referencias).

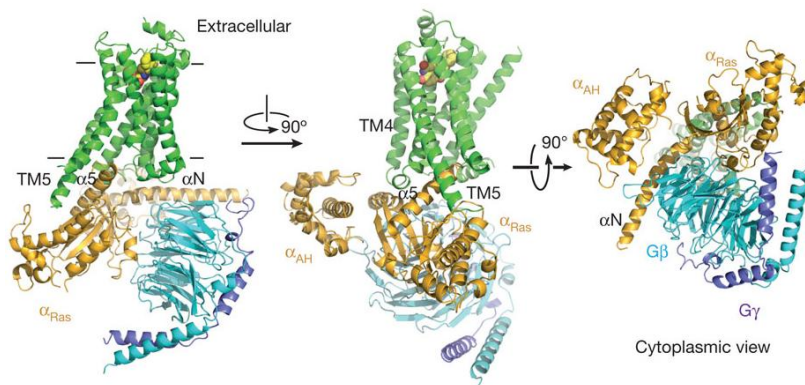


Figura 3. Estructura cristalina del receptor β_2 -adrenérgico acoplado a proteína Gs. (Extraído de Rasmussen et al., 2011)

1.1.2. Clasificación y estructura de los GPCRs

Los GPCRs se caracterizan por presentar una única cadena polipeptídica que cruza en siete ocasiones la membrana plasmática, por lo que también se les suele nombrar como receptores de siete dominios transmembrana (7TM) o receptores en serpiente, aunque no todos los receptores con dicha estructura señalizan a través de proteínas G. La primera clasificación que se propuso para los GPCRs los dividió en seis clases (A-F) en función básicamente de su homología de secuencia (Kolakowski, 1994). Actualmente se acepta una clasificación alternativa, conocida como *GRAFS* por las iniciales de cada familia, que divide los GPCRs presentes en vertebrados en cinco familias distintas (Fredriksson et al., 2003):

- *Familia de la rodopsina o clase A*: es la mayor familia de GPCRs e incluye receptores para una gran variedad de pequeñas moléculas, neurotransmisores, péptidos y hormonas, además de receptores olfativos, receptores del gusto y receptores para pigmentos visuales. Entre los miembros de esta familia encontramos el receptor de adenosina A_{2A} , el receptor cannabinoide CB_1 , el receptor huérfano GPR55, el receptor de grelina GHS-1a y el receptor de orexina OX_1 .

- *Familia de los receptores de secretina o clase B*: caracterizados por un largo ectodominio N-terminal y con similitudes morfológicas con el subgrupo de receptores para hormonas glicoproteicas de la familia A, aunque sin homología de secuencia. Incluye receptores para hormonas de elevado peso molecular. El receptor de la hormona liberadora de corticotropina CRF_2 es miembro de esta familia.

1. Introducción

- *Familia de receptores de adhesión*: filogenéticamente relacionados con la definida en la primera clasificación como clase B aunque difieren en el largo dominio N-terminal diana de proteólisis de los dominios transmembrana formando 2 sitios de proteólisis fuertemente conservados.
- *Familia de los receptores de Glutamato o clase C*: incluye receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y receptores sensores de Ca^{2+} , entre ellos los receptores GABA_B, los receptores del gusto, los receptores olfativos y los receptores de feromonas.
- *Familia de los receptores frizzled/TAS2*: incluye receptores implicados en el desarrollo embrionario y en la segmentación y polarización celular, entre otros.

Los GPCRs comparten una arquitectura estructural común de siete hélices transmembrana conectadas mediante tres bucles extracelulares y tres intracelulares. El extremo N-terminal se encuentra expuesto a la región extracelular, región responsable de reconocer a una gran variedad de ligandos y modular en parte su acceso al receptor; el extremo C-terminal, por su parte, se encuentra en la región intracelular, región responsable de la interacción con arrestinas, quinasas de GPCRs (GRKs) y otros efectores. Los siete segmentos transmembrana conforman el núcleo estructural del receptor, encargado de la unión de los ligandos y de la transducción de señales hacia la región intracelular mediante cambios de conformación.

La cristalización de GPCRs ha revelado diversas características comunes entre estos receptores. Se han identificado motivos altamente conservados en la hélice transmembrana 3 (TM3), relacionada con la conformación inactiva del receptor y el bloqueo de la unión de la proteína G, en la parte citoplasmática de la hélice TM6 considerado un *micro-switch* con cambios substanciales entre las conformaciones activa e inactiva del receptor, y en la hélice TM7 que juega un papel importante en la activación del receptor. Entre el segundo bucle extracelular y la hélice TM3 se ha descrito un puente disulfuro fuertemente conservado que juega un papel importante en la estabilización de la región extracelular y modela la entrada al centro ortostérico (Zhang et al., 2015). La estructura intracelular se encuentra relativamente conservada, hecho que correlaciona con la cantidad limitada de efectores intracelulares con los que se unen. Por otra parte, las regiones más variables se encuentran en los extremos carboxi- y amino-terminal y en las regiones intracelulares de los segmentos transmembrana 2 y 3 (Caltabiano et al., 2013). El extremo amino terminal es el que presenta una mayor diversidad, consistente con la gran variedad de ligandos naturales existentes. El análisis de las estructuras resueltas hasta el momento muestra como los ligandos usualmente se unen a la cavidad principal, localizada entre los segmentos extracelulares de los TM3, 5, 6 y 7 o a la cavidad menor localizada entre los segmentos extracelulares de los TM1, 2, 3 y 7 (Rosenkilde et al., 2010). A pesar de las características comunes de estas cavidades, su tamaño, forma y propiedades electrostáticas difieren de manera considerable entre receptores, incluso entre miembros de la misma subfamilia. Además, también se han descrito diferencias en el mecanismo de aproximación de los ligandos al centro ortostérico. Si en la mayoría de receptores se observa una prolongación hidrofílica del propio lugar de unión hacia una zona más extracelular facilitando el acceso (Zhang et al., 2015), en los receptores activados por ligandos lipídicos, el extremo N-terminal y los bucles extracelulares bloquean la entrada a la cavidad de unión (Hanson et al., 2012; Srivastava et al., 2014), sugiriendo que los ligandos lipofílicos podrían aproximarse al lugar de unión a través de la bicapa lipídica.

1.1.3. Activación y vías de señalización

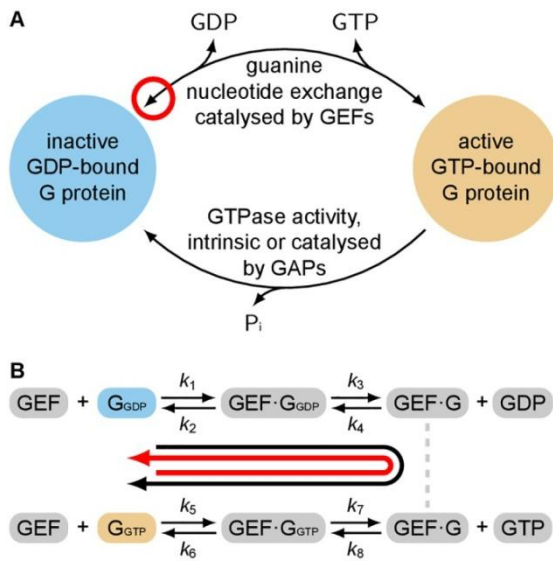


Figura 4. La activación de las proteínas G está regulada por factores GEF y actividad GTPasa. (A) El círculo rojo pone de manifiesto que el mecanismo asociado a GEF es completamente reversible, (B) dando lugar a distintos complejos GEF-proteína G con constantes cinéticas únicas para cada complejo. (Extraído de Stanley R. J. and Thomas G. H., 2016)

no es específica del complejo proteína G-GDP sino que también puede unirse al complejo proteína G-GTP (Stanley and Thomas, 2016) (Figura 4).

Se han descrito hasta 21 tipos de subunidades $G\alpha$ distintas codificadas por 16 genes distintos, 6 subunidades $G\beta$ codificadas por 5 genes y 12 subunidades $G\gamma$ (Downes and Gautam, 1999). Simon y colaboradores agruparon las subunidades $G\alpha$ en cuatro clases distintas en función de su homología de secuencia: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$ (Simon et al., 1991).

- *Familia $G\alpha_s$* : estimula la enzima adenilato ciclasa (AC), incrementando la producción de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), que a su vez activa dos proteínas quinasas A dependientes de cAMP (PKA).

- *Familia $G\alpha_{i/o}$* : inhibe la enzima AC. Dependiendo del tipo celular, el dímero $G\beta\gamma$ puede activar la vía de señalización dependiente de la enzima fosfolipasa $C\beta$ (PLC β), clásicamente acoplada a proteínas $G_{q/11}$, además de canales de potasio, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y proteína tirosina quinasa Src.

- *Familia $G\alpha_{q/11}$* : estimula la proteína PLC β , que induce la hidrólisis del lípido de membrana fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP2). El resultado es la formación de los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3 media la liberación de Ca^{2+} , el cual puede unirse a diversas proteínas de unión a Ca^{2+} conllevando la activación de diversas quinasas dependientes de Ca^{2+} . Por su parte, la diana intracelular del DAG es la proteína quinasa C (PKC), que constituye una superfamilia de proteínas que incluye PKCs

La unión del ligando al receptor induce cambios conformacionales que permiten la interacción con la proteína G heterotrimérica. Como su nombre indica, la proteína G está formada por tres subunidades, α , β y γ , y su función depende de la capacidad de la subunidad $G\alpha$ de ciclar entre su conformación inactiva unida a guanosina difosfato (GDP), preparada para interactuar con el receptor activado, y su conformación activa unida a guanosina trifosfato (GTP) y capaz de activar la cascada de señalización involucrando diferentes proteínas efectoras. Los GPCRs activados presentan actividad como GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) y provocan el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ lo cual induce finalmente la cascada de señalización dependiente del tipo de proteína G (Chung et al., 2011). El mecanismo catalítico dependiente de la actividad GEF es completamente reversible, es decir, que la unión de GEF

1. Introducción

convencionales (sensibles a Ca^{2+} , DAG y ésteres de forbol), PKCs nuevas (de activación independiente de Ca^{2+}) y PKCs atípicas (reguladas por fosfolípidos e insensibles a Ca^{2+} , DAG y ésteres de forbol) (Newton and Johnson, 1998).

- *Familia $G\alpha_{12/13}$* : son proteínas con homología de secuencia pero con vías de señalización diferenciadas. $G\alpha_{12}$ estimula la proteína fosfolipasa D (PLD) que puede producir DAG y por tanto activar diversas PKCs, proteínas tirosina quinasas como Src y Btk y proteína activadora de la actividad GTPasa para Rho (RhoGAP). Por su parte, $G\alpha_{13}$ es capaz de interactuar con múltiples factores intercambiadores de nucleótidos de guanina para Rho (RhoGEFs) (Siehler, 2009).

La unión del receptor a la proteína G parece depender de la interacción del extremo C-terminal de la hélice $\alpha 5$ de la subunidad $G\alpha$ en la cavidad creada por el movimiento del extremo citoplasmático del TM6 lejos del TM3 y hacia el TM5 (Caltabiano et al., 2013).

Efectivamente la subunidad $G\alpha$ presenta en su estructura un segmento proteico conservado formado por un dominio GTPasa y un dominio en hélice; el dominio GTPasa es capaz de hidrolizar GTP y proveer las regiones de unión para el dímero $G\beta\gamma$, para el receptor GPCR y para las proteínas efectoras, mientras el dominio en hélice está formado por seis hélices α conectadas entre sí que bloquean el lugar de unión a nucleótidos de guanina. Por su parte, las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ forman una única unidad funcional que tan solo puede disociarse bajo condiciones de desnaturalización (Schmidt et al., 1992) y dímeros formados por diferentes subunidades β y γ pueden interactuar con la misma isoforma de $G\alpha$, sugiriendo la importancia de la expresión y la localización subcelular en la regulación de la señalización asociada (Graf et al., 1992). El dímero $G\beta\gamma$ puede unirse y regular distintas proteínas efectoras, tales como canales iónicos o $\text{PLC}\beta$ (Figura 5).

Uno de los principales efectores activados por los GPCRs son las *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), también llamadas *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), que incluyen ERK1 (o MAPK3) y ERK2 (o MAPK1). Las quinasas ERK1 y 2 presentan una homología de secuencia del 85% y constituyen la pieza central de una cascada de señalización que regula una gran variedad de procesos celulares incluyendo proliferación, migración, diferenciación, supervivencia, crecimiento y apoptosis. Las proteínas ERK1/2 no fosforiladas se encuentran en estado inactivo y permanecen ancladas en el citoplasma formando un complejo junto a las quinasas Raf y MEK (MAPK/ERK *kinase*), además de diversas proteínas de anclaje que permiten su específica localización subcelular. La activación de ERK1/2 se consigue mediante la fosforilación secuencial de Raf y MEK y permite la liberación del complejo y la fosforilación de más de 150 substratos celulares distintos (Yoon and Seger, 2006). Son múltiples los GPCRs que pueden activar las quinasas ERK1/2 a través de vías dependientes de proteína G pero también mediante vías independientes de proteína G, como es la vía de señalización mediada por las β -arrestinas

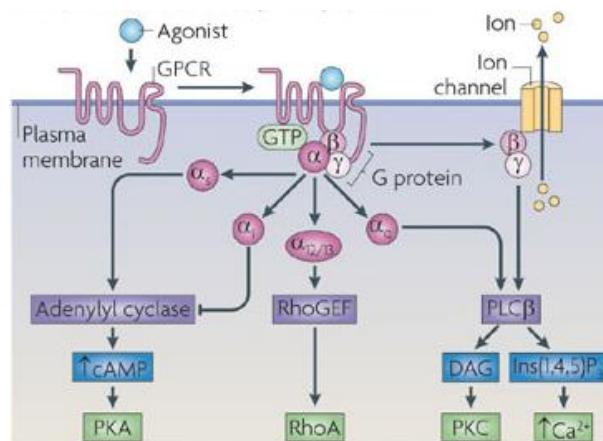


Figura 5. Vías de señalización mediadas por la activación de GPCRs. (Extraído de Ritter et al., 2009)

(Goldsmith and Dhanasekaran, 2007). La activación de Ras puede producirse a través de G_s , $G_{i/o}$ y $G_{q/11}$ además del dímero $G\beta\gamma$ (Antonelli et al., 2000; Mochizuki et al., 1999) y se ha reportado que la inhibición de PKA y PKC, quinasas importantes de las vías de señalización dependientes de proteína G, evitan la activación de ERK1/2 (Gesty-Palmer et al., 2006). Esta activación se produce en una fase temprana, de pocos minutos, como demuestra el estudio de la activación del receptor de la hormona tiroidea PTH1R (Gesty-Palmer et al., 2006). En cambio, las proteínas β -arrestinas que también pueden activar ERK1/2 de manera independiente a la proteína G, lo hacen en una fase más tardía (Azzi et al., 2003; Gesty-Palmer et al., 2006). Finalmente, la localización subcelular de ERK1/2 activadas está regulada por interacciones con diversas proteínas además de por la selectividad de los ligandos por los receptores, promoviendo destinaciones citoplasmáticas o nucleares (Volmat and Pouyssegur, 2001) y la mediación de las distintas respuestas celulares en las que están implicadas.

1.1.4. Actividad constitutiva y ligandos de los GPCRs

Cerione y colaboradores reportaron por primera vez que el receptor β_2 -adrenérgico podía encontrarse activo en un sistema que expresaba el receptor purificado y la proteína G heterotrimérica G_s en ausencia de su propia hormona (Cerione et al., 1984). Este efecto se llamó actividad constitutiva o actividad basal del receptor. Posteriormente, en células de glioblastoma que expresaban de manera endógena altos niveles del receptor δ -opioide, se observó que antagonistas competitivos del receptor mostraban una actividad intrínseca negativa al disminuir la actividad GTPasa en ausencia de agonista; este fenómeno únicamente se podía explicar con la actividad constitutiva del receptor δ -opioide (Costa and Herz, 1989).

Clásicamente los ligandos que actúan sobre GPCRs se clasificaban en agonistas (totales o parciales), antagonistas y agonistas inversos (totales o parciales). Mientras los agonistas promueven y estabilizan la conformación activa del receptor, siendo la promovida por el agonista total la más favorable para su señalización, los agonistas inversos inhiben la actividad basal induciendo la estabilización del receptor en su conformación inactiva. Por su parte, los antagonistas neutros previenen la unión de los agonistas y de los agonistas inversos pero sin influenciar el equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva del receptor. Este modelo se conoce como *modelo de los dos estados* y describe el estado basal como la conformación inactiva del receptor, apoyándose en estudios recientes que no muestran diferencias significativas entre la conformación del receptor libre y el receptor unido a agonistas inversos (Huang et al., 2013; Nygaard et al., 2013) (Figura 7b).

Por otra parte, también se sugieren modelos alternativos de tres estados; por un lado, se sugiere un estado intermedio basal en el que el receptor muestra cierta actividad, de manera que los agonistas inversos favorecen la transición hacia el estado inactivo mientras los agonistas favorecen la transición hacia el estado totalmente activo (Figura 7a); alternativamente, se plantea otro modelo de tres estados en el que se sugiere una conformación inactiva del receptor en estado basal, de manera que los agonistas favorecen la transición a estados intermedios y son los efectores quienes promueven el estado de activación completa (Figura 7c). Este último modelo no contradice los resultados de Huang et al y está definitivamente respaldado por otros estudios de cristalización y resonancia magnética nuclear en los que se demuestra que los mayores cambios estructurales que experimenta un receptor al activarse solo se detectan mediante la co-cristalización de

1. Introducción

receptor y proteína G o con un anticuerpo que mimetice el efecto de la proteína G. Efectivamente, estos resultados sugieren que, en presencia únicamente del agonista, el receptor transita entre diferentes conformaciones intermedias en función de los substratos y que la asociación con la proteína G es la que estabiliza el receptor en una conformación completamente activa (Figura 7c).

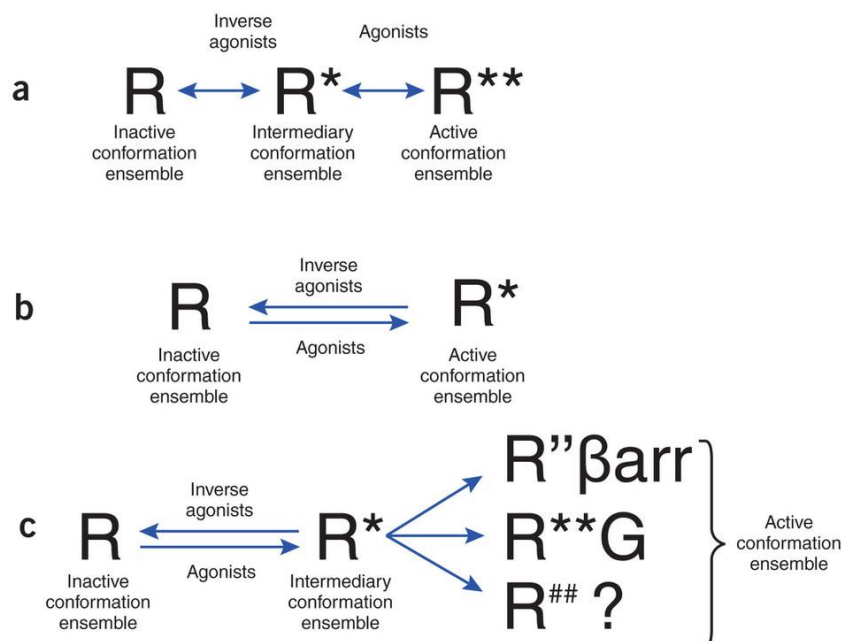


Figura 7. Modelos alternativos que describen la transición entre los estados activo e inactivo en los GPCRs. (a) Modelo de tres estados que prevé una conformación intermedia para el receptor en estado basal en el que muestra cierta actividad. (b) Modelo clásico de dos estados. (c) Modelo de tres estados en que el receptor en estado basal se encuentra en conformación inactiva. (Extraído de Bouvier M, 2013)

Estas observaciones permiten proponer la existencia de diferentes conformaciones activas del receptor en función de la asociación con diferentes proteínas efectoras. Este mecanismo permite explicar por primera vez el fenómeno del *ligand-biased signaling* o de selectividad funcional, donde diferentes ligandos activan de manera diferencial distintas vías de señalización al actuar sobre un mismo receptor (Rankovic et al., 2016; Violin et al., 2014). En efecto, en la Figura 8 se muestra como ejemplo la diferente activación sobre diversas vías de señalización que pueden provocar los ligandos endógenos y alostéricos sobre el mismo receptor.

Los ligandos endógenos se unen al centro ortostérico mientras que los ligandos alostéricos son capaces de influenciar la actividad del receptor al unirse a lugares topográficamente distintos: los centros alostéricos (Melancon et al., 2012). Los ligandos alostéricos median sus efectos induciendo cambios de conformación que son transmitidos desde el centro alostérico hasta el centro ortostérico y/o directamente a los lugares de unión de las proteínas efectoras (Kenakin and Miller, 2010; Wootten et al., 2013) (Véase apartado 1.2.2. Alostérico en GPCRs).

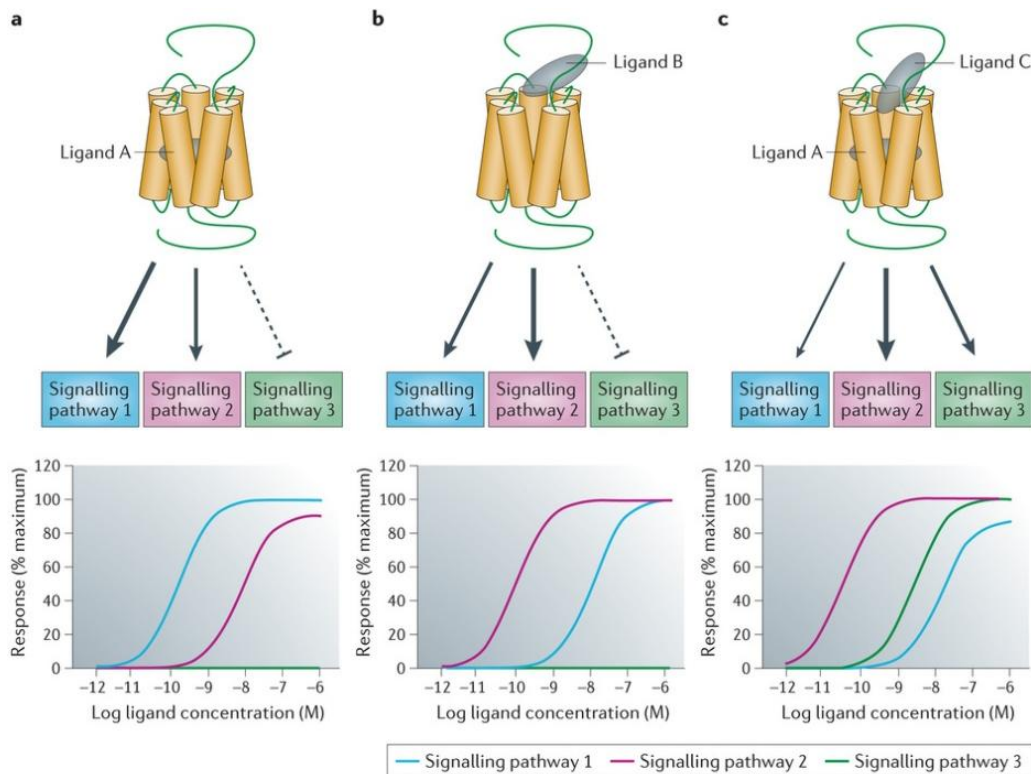


Figura 8. Ejemplo de señalización *bias* en que se produce un cambio de potencia o eficacia del agonista. (a) El ligando A presenta una potencia elevada y actividad como agonista total para la vía de señalización 1, menor potencia y efectos como agonista parcial para la 2 y no señaliza por la vía 3. (b) El ligando alostérico B tiene mayor potencia para la vía 2 que para la 1. (c) Aún con el ligando A unido al sitio ortostérico, la unión del modulador alostérico C induce una alteración *biased* en la señalización, potenciando la activación de la vía 2 y 3 y afectando negativamente la activación de la vía 1. (Extraído de Wooten et al., 2013)

1.1.5. Regulación de la actividad de los GPCRs

La cinética de la activación de la proteína G depende de múltiples factores, entre ellos la afinidad del ligando por el receptor, la afinidad del receptor por la proteína G, las concentraciones intracelulares de las proteínas y la cinética de desactivación del receptor. Hemos comentado que la subunidad $G\alpha$ presenta actividad GTPasa intrínseca. Dicha actividad está regulada por proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa, llamadas RGS (*regulators of G-protein signaling*), así como por las propias proteínas efectoras. Las RGS estabilizan el estado de transición de la subunidad $G\alpha$ ($G\alpha$ -GDP) y coordinan el posicionamiento del residuo catalítico de $G\alpha$ que es crítico para la actividad GTPasa intrínseca (Kimple et al., 2011). Este mecanismo que acelera la terminación de la señal en gran variedad de sistemas de señalización mediante proteínas G pequeñas o heterotriméricas está altamente conservado en la evolución en organismos tan diversos como las levaduras y los humanos (Kohout and Lefkowitz, 2003; Neitzel and Hepler, 2006). Recientemente se ha descrito la reversibilidad del mecanismo catalizado por proteínas con actividad GEF, mostrando una nueva vía de inactivación de la proteína G (Stanley and Thomas, 2016) (Véase apartado 1.1.3. Activación y vías de señalización).

La administración prolongada o repetida de un agonista induce generalmente una pérdida o atenuación de la respuesta del receptor, conocida como desensibilización. El principal mecanismo de desensibilización implica la fosforilación de diversos residuos en la larga cola

1. Introducción

del extremo carboxi-terminal por parte de quinasas serina-treonina específicas, concretamente, miembros de la familia GRK. La fosforilación del extremo C-terminal así como los cambios conformacionales del receptor inducidos por la unión del agonista contribuyen a la interacción con β -arrestinas, que inducen la desensibilización del receptor (Lefkowitz and Shenoy, 2005), considerándose un mecanismo universal para todos los GPCRs (Kohout and Lefkowitz, 2003). Los GPCRs pueden unir cuatro arrestinas distintas: las formas 1 y 4, también llamadas arrestinas visuales, se unen a la forma activa del fotoreceptor rodopsina fosforilado, mientras que las formas 2 y 3 regulan la actividad de los GPCRs no visuales (Gurevich and Gurevich, 2006). Las arrestinas comprenden dos dominios N- y C-terminales formados por láminas β anti-paralelas conectadas por una región bisagra (Granzin et al., 1998). Juegan un importante papel como adaptadores endocíticos, poniendo en contacto los receptores con la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina (Claing et al., 2002; Shenoy and Lefkowitz, 2003).

Tras la internalización, los GPCRs se dividen en dos grupos dependiendo del tipo de unión a la β -arrestina. Por un lado, los receptores de la clase A pierden la unión a β -arrestina al internalizarse (Oakley et al., 2000), de manera que pueden ser desfosforilados y reciclados de nuevo a la membrana o pueden seguir señalizando desde los endosomas (Mullershausen et al., 2009), aumentando la eficiencia de las vías transcripcionales al verse reducida la distancia al núcleo (Tsvetanova and von Zastrow, 2014). Por otro lado, los receptores de la clase B mantienen la unión con la β -arrestina, de manera que la fosforilación mediada por proteínas GRK puede inducir la ubiquitinización del receptor. Posteriormente, se han identificado las proteínas de la familia GASP (*GPCR-associated sorting protein*), que asisten en la decisión de reciclar o degradar el receptor (Bornert et al., 2013; Simonin et al., 2004). En todo caso, la endocitosis de los receptores juega un papel importante en la resensibilización por desfosforilación, reciclaje, regulación negativa y señalización (Claing et al., 2002).

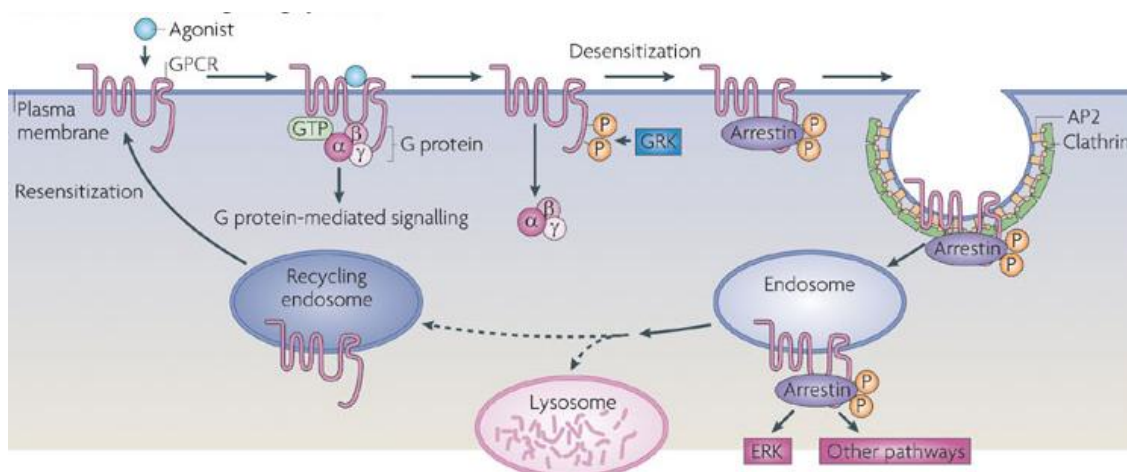


Figura 6. Vías de señalización mediadas por β -arrestinas. (Extraído de Ritter et al., 2009)

Aunque las β -arrestinas se definieron originalmente como terminadores de la señal mediada por proteínas G, hoy en día se consideran adaptadores multifuncionales, proteínas de andamiaje e importantes transductores de señales (Figura 6). Las arrestinas unen un gran número de proteínas catalíticamente activas reclutadas por los GPCRs activados, entre ellas proteínas de la familia de tirosina quinasas Src, componentes de la familia de las MAPK como ERK1/2 y *c-Jun N-terminal kinase* tipo 3 (JNK3), ubiquitina ligasa E3, fosfodiesterasas

de cAMP (PDE) y DAG quinasas, entre otras (Luttrell and Gesty-Palmer, 2010). Concretamente, la facilitación de la activación de la vía de las MAPK tiene importantes implicaciones a nivel de quimiotaxis, motilidad celular e inhibición de la apoptosis, entre otros procesos celulares (Lefkowitz and Shenoy, 2005). Mientras muchos de los efectores unidos a las arrestinas modulan la señalización vía proteína G, degradan segundos mensajeros y regulan la endocitosis y el tráfico intracelular, otros regulan la traducción proteica y la transcripción génica. La señalización dependiente de arrestinas juega un papel importante en la retina, sistema nervioso central (SNC), sistema cardiovascular, remodelación ósea, sistema inmune y cáncer (Luttrell and Gesty-Palmer, 2010).

1.2. Oligomerización de GPCRs

Clásicamente se ha considerado que los GPCRs existen y funcionan como entidades monoméricas. La transducción de la señal, pues, depende de una reacción en cadena en la que el ligando se une a su receptor e induce cambios conformacionales que permiten la activación de enzimas y segundos mensajeros y finalmente la generación de efectos transcripcionales y no transcripcionales (como la fosforilación de distintas proteínas con un efecto regulador) para completar la transmisión y amplificación de dicha señal. Sin embargo, en los años noventa aparecieron múltiples evidencias bioquímicas y biofísicas que no podían ser explicadas considerando los GPCRs de manera individual; este fue el inicio del estudio de la oligomerización de GPCRs. Este fenómeno pone de manifiesto la capacidad de los GPCRs para interactuar entre sí formando complejos homodiméricos, heterodiméricos y oligoméricos de orden superior (Bouvier, 2001; Ferré et al., 2009; Lee et al., 2003). El término *homómero de receptores* hace referencia al complejo molecular que combina dos o más receptores individuales funcionales e idénticos, mientras por *heterómero de receptores* entendemos un complejo macromolecular formado por la unidad mínima de dos receptores individuales, funcionales y distintos entre sí, que constituyen una única unidad con propiedades bioquímicas y funcionales demostrablemente diferentes a las de sus componentes individuales. De ambas definiciones se desprende la posible formación de multímeros u oligómeros de receptores de orden superior, como de hecho así demuestran evidencias recientes (Carriba et al., 2008; Guo et al., 2008). Estas estructuras constituyen una única unidad funcional, adquiriendo nuevas características respecto a los receptores individuales.

A nivel de SNC, Fuxe y colaboradores aportaron las primeras evidencias sobre interacciones receptor-receptor mediante el estudio de la regulación por neuropéptidos de receptores de dopamina y serotonina (Fuxe et al., 1983). Poco después, Maggio y colaboradores demostraron la existencia de un *crossstalk* intermolecular entre receptores muscarínicos y adrenérgicos; transflectaron células COS-7 con estructuras químicas formadas por los receptores $\alpha 2$ -M3 y M3- $\alpha 2$ en los que la porción C-terminal conteniendo los segmentos TM6 y TM7 fue intercambiada entre ambos receptores. Al transflectar los mutantes $\alpha 2$ o M3 individualmente no se detectó ningún tipo de unión de ligandos pero al transflectar ambos se observó la aparición de sitios de unión con propiedades similares a los receptores *wild type* (WT) (Maggio et al., 1993). Estos resultados sugerían de manera muy evidente la capacidad de interacción de ambos receptores a nivel molecular.

Hasta la década de los 90, las representaciones de Scatchard no lineales (ecuaciones utilizadas para calcular las constantes de afinidad de un ligando por una proteína) se interpretaban asumiendo diversos grados de acoplamiento entre receptores monoméricos y

proteínas G (Franco et al., 2003). La interacción directa de GPCRs formando dímeros permitió dar otra explicación sin necesidad de incluir la interacción con proteínas G en la ecuación. Efectivamente, la presencia de dímeros y la existencia de cooperatividad en la unión de ligandos, sea negativa o positiva, justifica porque un agonista aparentemente modifica el porcentaje de receptores con elevada afinidad por el ligando (Casadó et al., 1991; Wreggett and Wells, 1995). Es el caso del heterómero formado por los receptores de adenosina A_1 y de dopamina D_1 , en el que los agonistas del receptor A_1 inhiben la unión de análogos de la dopamina al receptor D_1 , de manera que a nivel fisiológico en el estriado, antagonistas del receptor A_1 inducen un aumento de la actividad locomotora mediada por dopamina (Ginés et al., 2000). De manera análoga ocurre en el heterómero de receptores A_{2A} - D_2 , en el que la activación de receptores A_{2A} disminuye la unión de dopamina a receptores D_2 . De hecho, en Japon se aprobó en 2013 el uso de la istradefilina o KW-6002 (comercializado como Nourias[®]), un antagonista selectivo de los receptores A_{2A} que reduce las disquinesias asociadas a los tratamientos a largo plazo con fármacos antiparkinsonianos clásicos como la levodopa (Dungo and Deeks, 2013). Por lo tanto, uno de los papeles de la dimerización es la regulación dinámica en la membrana plasmática mediada por la unión de ligando, además del establecimiento de cooperatividad positiva o negativa que permite potenciar o atenuar la señal o inducir cambios en la selectividad de proteínas G (Terrillon and Bouvier, 2004).

La importancia de la oligomerización no se limita a la modulación funcional a nivel de membrana plasmática (Figura 9). En algunos casos la dimerización juega un papel clave en la maduración del receptor, en el proceso ontogénico; la salida del retículo endoplasmático (RE) es un paso crucial que controla la expresión de los GPCRs en la superficie celular. La oligomerización permite en muchos casos enmascarar las señales de retención específicas así como segmentos hidrofóbicos que inducirían su retención en el RE (Reddy and Corley, 1998). El ejemplo paradigmático entre los GPCRs es el del receptor de ácido γ -aminobutírico tipo B ($GABA_B$), miembro de la familia C o de receptores metabotrópicos de glutamato, compuesto por las subunidades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ (Marshall et al., 1999). Si se expresa sola, la subunidad $GABA_{B1}$ queda retenida en el RE por una secuencia de retención en el extremo carboxi-terminal (Margeta-Mitrovic et al., 2000); por su parte, la subunidad $GABA_{B2}$ sí es capaz de llegar a la superficie celular pero no es funcional. La heterodimerización permite enmascarar la secuencia de retención de $GABA_{B1}$ y la expresión en la membrana de un receptor funcional. El papel de la dimerización en la vía secretora se ha observado para diversos GPCRs.

La formación de heterómeros puede también promover la co-internalización de dos receptores tras la estimulación de un solo protómero del complejo; de manera alternativa, la presencia en el complejo de un protómero resistente a la internalización promovida por un agonista puede inhibir la internalización del complejo (Milligan, 2010).

Las interacciones no se limitan a la formación de complejos entre GPCRs sino también a interacciones con gran variedad de proteínas a nivel de membrana plasmática (interacciones horizontales) y a través de ella, desde regiones extracelulares a regiones intracelulares (interacciones verticales) (Franco et al., 2003). La oligomerización como tal así como la reorganización de los receptores en la membrana inducida por la unión de ligandos promueven la formación de agregados o *clusters* junto con proteínas de andamiaje, condicionando las características farmacológicas, la señalización y el tráfico de los oligómeros individuales (Franco et al., 2003).

Hoy en día, las interacciones entre GPCRs están plenamente aceptadas y se consideran cruciales para entender la gran variedad de *cross-talk* funcionales observados especialmente para receptores de neurotransmisores.

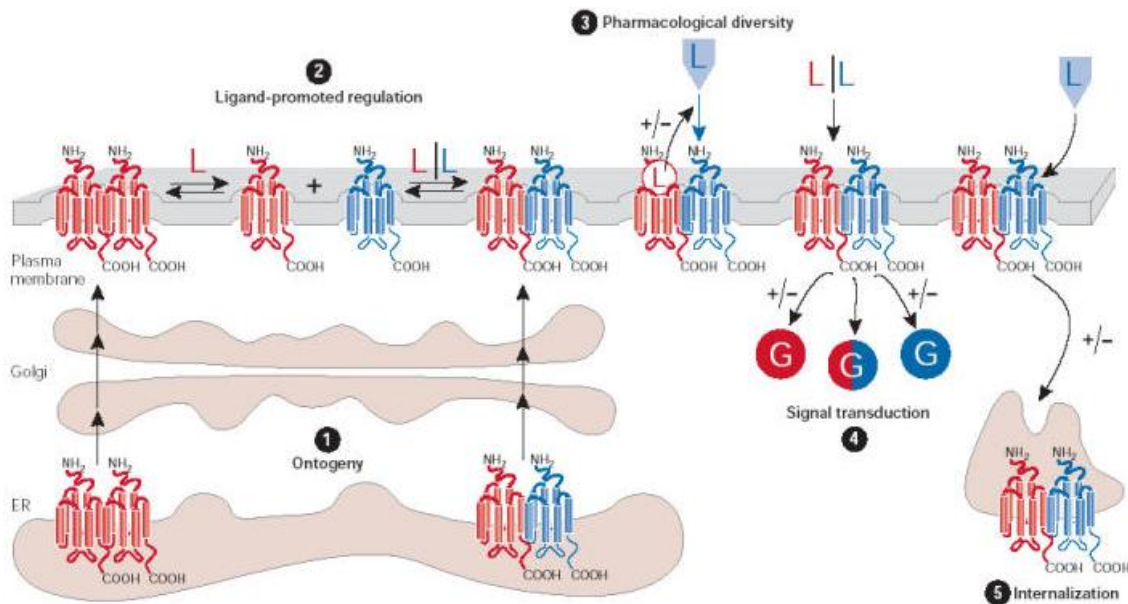


Figura 9. Papeles funcionales potenciales de la oligomerización durante el ciclo de vida de los GPCRs. G = protein G; L = ligandos; ER = retículo endoplasmático. (Extraído de Terrillon S and Bouvier M, 2004)

1.2.1. Interfases entre GPCRs y dominios de interacción con las proteínas G

La oligomerización de GPCRs se produce debido a interacciones moleculares directas entre los receptores, pudiendo involucrar proteínas que permitan la formación y estabilización de estructuras complejas. Las interacciones indirectas se deben a la unión de los dominios intracelulares de los receptores con proteínas citosólicas, algunas de ellas descritas como proteínas de andamiaje con un papel preferencialmente estructural y otras como proteínas involucradas en la transducción de la señal (Ciruela et al., 2005). Por lo que respecta a las interacciones directas, la resolución de múltiples estructuras ha permitido definir diversas interfases de contacto entre los protómeros.

Experimentos de *cross-linking* sugieren la implicación de interacciones hidrofóbicas en los TM1, 4 y 5 en la oligomerización de GPCRs (Guo et al., 2005, 2008; Klco et al., 2003). La resolución de las estructuras de los receptores μ -opioide (Manglik et al., 2012) y β_1 -adrenérgico (Huang et al., 2013) formando homo-oligómeros ha revelado la existencia de dos interfases de contacto, implicando los TM1 y 2 en la primera interfase y los TM4 y 5 o 5 y 6 en la segunda. Recientemente, Navarro y colaboradores reportaron por primera vez la estructura de un tetrámero, formado por un dímero de receptores A_1 y por un dímero de receptores A_{2A} (Navarro et al., 2016) (Figura 10). El heterotetrámero presenta una arquitectura en forma de rombo unido a dos proteínas G distintas, G_s y $G_{i/o}$, estableciéndose dos interfases de contacto distintas: TM4/5 para el homodímero y TM5/6 para el heterodímero. En cada dímero, un único protómero se une con la proteína G. Por su parte, la subunidad α de la proteína G_s y $G_{i/o}$ miran hacia el interior del tetrámero mientras los extremos N-terminales de las hélices α de ambas subunidades se colocan hacia el exterior del complejo (Navarro et al., 2016).

En la oligomerización también se han descrito interacciones electrostáticas de los dominios intracelulares (Navarro et al., 2010a).

La estequiometría receptor/proteína G sigue siendo un tema de debate. Diversos estudios han mostrado que los receptores monoméricos son capaces de ser completamente funcionales en su activación de la proteína G; es el caso de los receptores β_2 -adrenérgico, rodopsina y μ -opioide embebidos como entidades monoméricas en *nanodiscs* (discos a escala nanométrica formados por una bicapa lipídica estabilizada mediante proteínas MSP [*membrane scaffold proteins*] generalmente proteína apoA-1 humana de alta densidad) (Whorton et al., 2007). Además de estos receptores de la familia A de GPCRs, también se han reportado miembros de la familia C capaces de activar completamente la proteína G en una estequiometría 1:1 (El Moustaine et al., 2012). Otros estudios, principalmente estructurales, demuestran la necesidad de una estequiometría 2:1 (Han et al., 2009; Pellissier et al., 2011). A favor del dímero como unidad mínima de señalización unido a una única proteína G se encuentran múltiples evidencias bioquímicas y estructurales que sugieren la existencia en las proteínas G de dos regiones distintas de interacción con los GPCRs (Oldham and Hamm, 2006). El primer sitio de unión se encuentra en la hélice C-terminal de la subunidad $G\alpha$, que penetra en una fisura accesible tras el cambio de conformación del dominio citoplasmático debido a la activación del receptor (Hofmann et al., 2009); el segundo se encuentra en la región C-terminal de la subunidad $G\gamma$. Ambos sitios de unión se encuentran a una distancia de 55 Å en la proteína G heterotrimérica, distancia superior a los 45 Å que ocupa un GPCR en el plano de la membrana, aproximadamente, indicando que una única proteína G contacta con dos receptores de una manera asimétrica como así sugiere la estructura del receptor de rodopsina (Filípek et al., 2004; Johnston and Siderovski, 2007; Palczewski et al., 2000). De esta manera, si dos receptores están interaccionando en la membrana, tan solo hay espacio para una sola proteína G. El resultado es una estructura estable y completamente funcional.

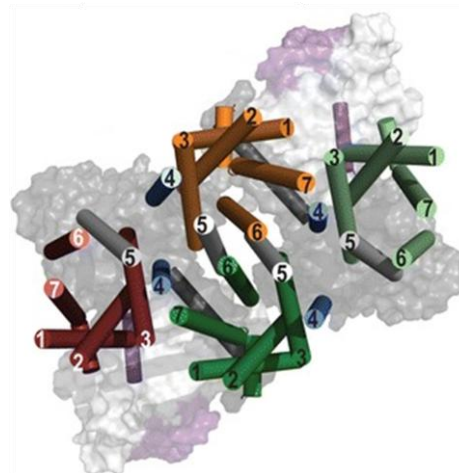


Figura 10. Modelo molecular del tetrámero formado por los dímeros de receptores A₁-A_{2A} en complejo con las proteínas G_s y G_i. El receptor A₁ unido a G_i se muestra en rojo mientras el no unido, en naranja. El receptor A_{2A} unido a G_s se muestra en verde oscuro, mientras el no unido, en verde claro. Las subunidades α , β y γ de las proteínas G_i y G_s se muestran en gris oscuro, gris claro y púrpura respectivamente, mientras las hélices transmembrana 4 y 5 están resaltadas en azul claro y gris, respectivamente. (Extraído de Navarro G et al., 2016)

1.2.2. Alosterismo en GPCRs

Por alosterismo se entiende el proceso por el cual un ligando interacciona en un lugar concreto de una proteína, llamado sitio alostérico, influenciando la unión o la función del mismo u otro ligando al unirse a un lugar topográficamente distinto (Christopoulos and Kenakin, 2002). Como se ha descrito con anterioridad, los GPCR forman complejos oligoméricos. En estos complejos también puede tener lugar el proceso de alosterismo

entre diferentes protómeros del mismo complejo u otras proteínas de unión. A nivel de GPCRs se pueden considerar tres tipos de alosterismo: *clásico*, en el que la diana del modulador alostérico es un ligando distinto que se une al lugar ortostérico; *lateral*, en el que la diana de la modulación es un componente del plano de la membrana, y *citósólico*, de manera que la diana del ligando alostérico se sitúa en el interior celular. Tanto el alosterismo clásico como el citósólico pueden dar lugar al fenómeno de funcionalidad selectiva, es decir, la habilidad de un ligando para promover de manera selectiva una vía de señalización específica (Reiter et al., 2012) mediante cambios de conformación que favorecen o perjudican la unión de una proteína en particular o alteran su conformación. El fenómeno de funcionalidad selectiva da lugar a la definición de ligandos agonistas y antagonistas *biased* (Reiter et al., 2012), que se revelan beneficiosos a nivel terapéutico para mejorar la eficiencia de los tratamientos y reducir los efectos adversos (Véase apartado 1.1.4. Actividad constitutiva y ligandos de los GPCRs).

El alosterismo permite entender las propiedades bioquímicas de los homómeros y heterómeros de GPCRs, considerando de manera genérica un protómero del complejo como la diana del modulador alostérico y el mismo o el otro protómero como el receptor de la energía termodinámica alostérica generada. En el modelo clásico de un monómero y una proteína G, se consideran dos poblaciones de receptores que no están en equilibrio, teniendo en cuenta que una población no está unida a proteína G mientras la otra sí, con gran afinidad por el agonista (De Lean et al., 1980). En el modelo dimerico, la comunicación alostérica entre protómeros permite la cooperatividad sea negativa o positiva, es decir, que la unión de un ligando al primer protómero disminuye o aumenta la afinidad del ligando por el segundo protómero, respectivamente, permitiendo explicar las complejas curvas de unión obtenidas mediante experimentos de radioligandos antes de la década de los 90 (Casadó et al., 2007). A diferencia del modelo monomérico, el modelo dimerico no asume una cantidad limitada de proteínas G y éstas actúan como un modulador alostérico adicional que incrementa la afinidad por el agonista y estabiliza la conformación del dímero que permite la cooperatividad entre ambos protómeros del complejo (Ferré et al., 2014). La cooperatividad, sea negativa o positiva es, pues, un tipo particular de modulación alostérica considerada una propiedad de algunos ligandos al unirse a oligómeros de GPCRs y que puede proveer de un mecanismo que proteja a los sistemas biológicos contra elevaciones agudas de ligandos endógenos (Agnati et al., 2005) o funcionar como mecanismo de amplificación de la señal, respectivamente.

1.2.3. Técnicas para la identificación de oligómeros de GPCRs

Como se ha comentado anteriormente, mediante los estudios farmacológicos y experimentos de unión de radioligandos, se obtuvieron las primeras evidencias de la existencia de interacciones moleculares entre GPCRs. En el estudio de Maggio y colaboradores se utilizaron por primera vez receptores mutantes para poner de manifiesto la oligomerización de GPCRs (Maggio et al., 1993), pero entre las técnicas más usadas para estudiar la dimerización de estos receptores cabe destacar la co-inmunoprecipitación, técnica bioquímica en la que las proteínas de interés se aíslan mediante la precipitación de un receptor con anticuerpos específicos mientras la existencia de interacciones se detecta con anticuerpos específicos contra otros receptores del complejo. Hebert y colaboradores demostraron la interacción entre los receptores β_2 -adrenérgicos mediante esta técnica (Hebert et al., 1996) y a raíz de este estudio han sido múltiples los homodímeros reportados. Sin embargo, mediante esta técnica se establecen evidencias de interacciones

1. Introducción

directas proteína-proteína que pueden resultar ambiguas, teniendo en cuenta que requiere de la previa solubilización de las membranas mediante detergentes, lo que puede provocar la observación de falsos positivos por la formación de agregados proteicos debido a la naturaleza hidrofóbica de los receptores.

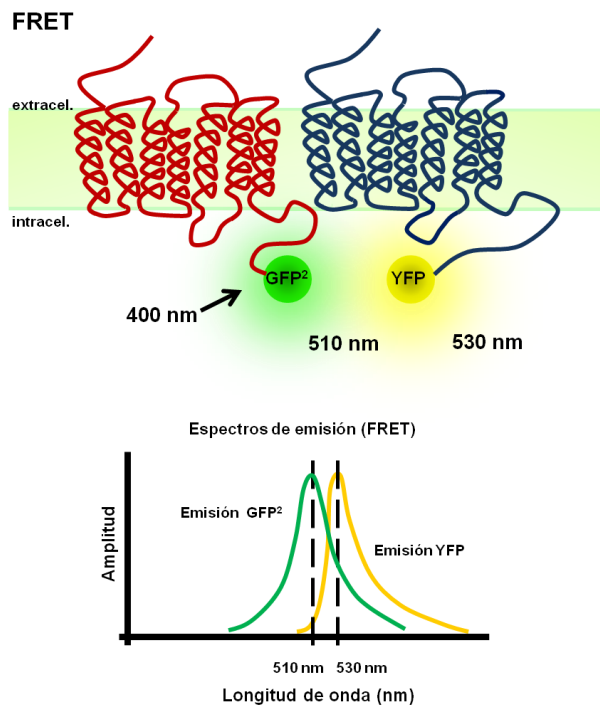


Figura 11. Representación esquemática del fenómeno de FRET y sus correspondientes espectros de emisión.

fluorescente o luminiscente mientras que el otro protómero se fusiona con una proteína aceptora fluorescente. Si la energía transmitida es fluorescente, hablamos de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) mientras que si energía transmitida es bioluminiscente, hablamos de *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (BRET). Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que tanto dador como aceptor estén a una distancia inferior a 100 Å o 10 nm, distancia a la cual se encuentran la mayor parte de complejos multiproteicos presentes en una célula (Sheng and Hoogenraad, 2007; Stryer, 1978). Por otra parte también es necesario que el espectro de emisión del dador se solape con el espectro de excitación del aceptor, de manera que pueda transmitirse una parte de la energía de manera directa y el aceptor emita como si hubiera sido excitado directamente. Los estudios de FRET y BRET se describieron inicialmente para proteínas G de levaduras (Janetopoulos et al., 2001) y posteriormente para GPCRs (Angers et al., 2000; Galés et al., 2005; Vilardaga et al., 2003) y proteínas G (Bünemann et al., 2003) en células de mamíferos.

En la técnica de FRET se requiere la fusión de las proteínas de estudio a diferentes variantes de la proteína fluorescente verde GFP (*Green Fluorescent Protein*), siendo las más comúnmente estudiadas la variante GFP² como dadora y la variante YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) como aceptora. En esta técnica, cuando se excita de manera extrínseca la proteína GFP² a 400 nm, ésta emite fluorescencia a 510 nm, solapándose con el espectro de excitación de la proteína aceptora YFP; si ambas proteínas están suficientemente próximas en el espacio, se producirá la transferencia de energía que permitirá la excitación y consecuente emisión de la proteína YFP a 530 nm (Figura 11). La saturación de la transferencia observada para proteínas formando oligómeros específicos previene la señal

La explosión de datos que apoyan la existencia de homómeros y heterómeros entre receptores de GPCRs en células intactas se debe principalmente a la aplicación de técnicas biofísicas como las técnicas de transferencia de energía por resonancia. En 1948, Theodor Förster describió el principio básico de la transferencia de energía por resonancia (RET), que consiste en la transferencia de energía no radiativa desde un cromóforo excitado conocido como dador hacia una molécula aceptora cercana (Förster T, 1948). La aplicación de este principio al estudio de los GPCRs permitió describir interacciones entre receptores en células vivas como medida de su proximidad. La técnica requiere la co-expresión de las proteínas de estudio de manera que un protómero del potencial complejo se fusiona con una proteína dadora

de FRET no específica debida a colisiones al azar por sobreexpresión de las proteínas fluorescentes, problema común en las técnicas basadas en el principio RET (Piston and Kremers, 2007). Por otra parte, el ajuste *linear unmixing* (Zimmermann, 2005) permite discriminar claramente diferentes características espectrales dentro de una muestra cuando se utilizan fluoróforos distintos cuyos espectros se solapan parcialmente, problema inherente a técnicas como la de FRET. El ajuste de Zimmerman es un método que asume que la señal total detectada en cada canal puede ser expresada como una combinación lineal de los fluoróforos que contribuyen, de manera que permite analizar contribuciones mezcladas en un solo píxel. Es decir, en lugar de medir la intensidad (espectral), mediante este ajuste se mide el decaimiento de fluorescencia en el tiempo y la contribución de cada fluoróforo a cada canal espectral sucesivo.

En la técnica de BRET se requiere la fusión de una de las proteínas de estudio con una enzima luminiscente que actúa de proteína dadora mientras la otra se fusiona con una proteína fluorescente. Se han descrito dos variantes de la técnica de BRET, el BRET¹, en que la proteína dadora es la enzima *Renilla reniformis* luciferasa (*RLuc*) o una variante de ésta, capaz de catalizar la oxidación del sustrato luminiscente *coelenterazina H* en presencia de oxígeno emitiendo luz a 485 nm que será transferida a la proteína YFP, y el BRET², en el que la enzima *RLuc* oxida un sustrato diferente, el DeepBlueC, que emite a 400 nm excitando a la proteína GFP² (Figura 12). En la última década la técnica de BRET se ha utilizado para investigar múltiples interacciones proteína-proteína, especialmente en el campo de los GPCRs (Ayoub and Pflieger, 2010; Ferré et al., 2010; Lohse et al., 2012) y más recientemente se ha aplicado también al estudio de procesos celulares dinámicos, sea previo tratamiento farmacológico o mediante el desarrollo de biosensores para diversas vías de señalización (Salahpour et al., 2012).

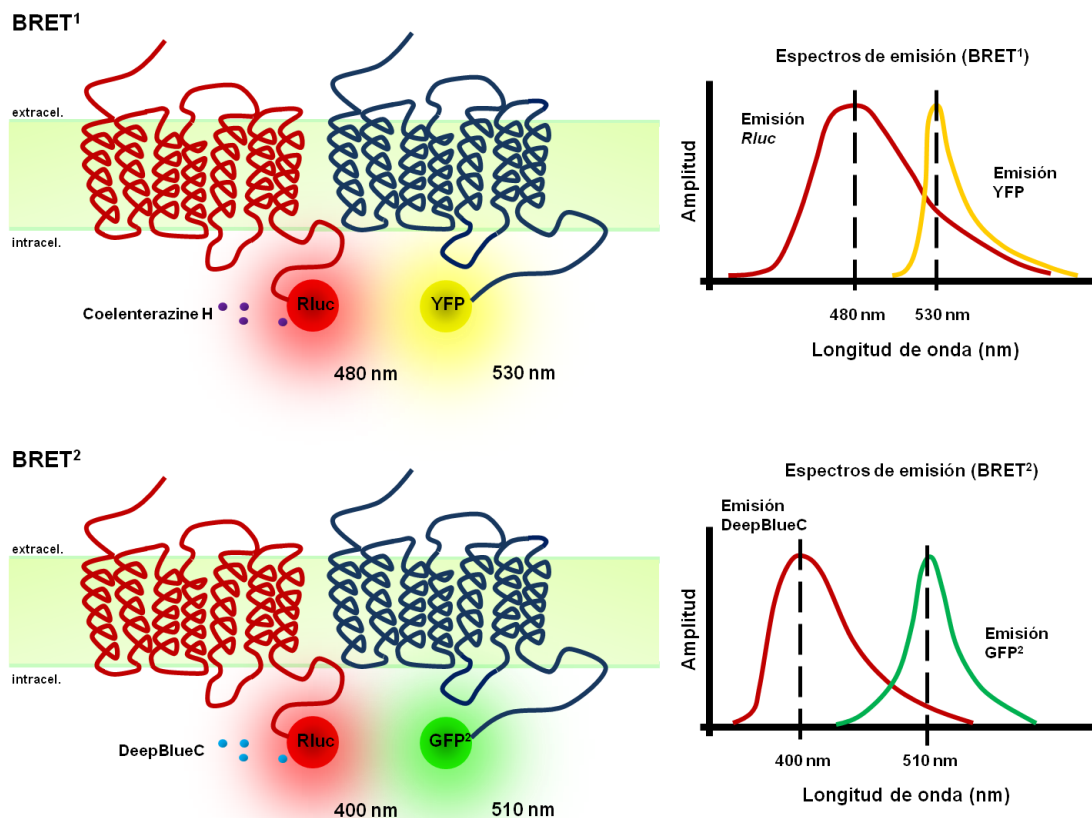


Figura 12. Representación esquemática de los fenómenos de BRET¹ y BRET² y sus correspondientes espectros de emisión.

1. Introducción

Existen ciertas diferencias entre las técnicas de BRET y FRET. La técnica de BRET no permite la localización celular del fenómeno biológico estudiado, mientras sí es posible mediante la realización de la técnica de FRET por microscopia; por otra parte, a diferencia de la técnica de FRET, la técnica de BRET no precisa de una estimulación externa para iniciar la transferencia de energía, de manera que se evita tanto el ruido de fondo debido a la estimulación directa así como el fenómeno de *photobleaching*, además del posible solapamiento parcial de los espectros de emisión de las dos proteínas fluorescentes. Estos inconvenientes también son evitados mediante una nueva evolución de la técnica de FRET, el *time-resolved* FRET (TR-FRET) (Ciruela et al., 2010; Pflieger and Eidne, 2005). Dicha técnica requiere de un fluoróforo de vida larga (300-1000 μ s) como el Eu^{3+} -*cryptate* (Mathis, 1995), que permite la excitación prolongada de la proteína aceptora fluorescente roja en ausencia de un estímulo externo continuado, disminuyendo el ruido de fondo y el posible solapamiento de los espectros de emisión. Mediante TR-FRET se ha podido validar la existencia de múltiples oligómeros de GPCRs en la superficie de células intactas mediante el uso de anticuerpos específicos marcados para los receptores diana, que a su vez constituyen su principal limitación potencial, y mediante ligandos marcados que permiten la realización de experimentos de unión de ligandos sin necesidad de radioactividad (Maurel et al., 2008).

Las técnicas de BiFC/BiLC (*Bimolecular Fluorescence or Luminescence Complementation*) permiten también la detección directa de interacciones proteína-proteína en células vivas (Hu et al., 2002). Consisten en la reconstitución funcional de proteínas activas, típicamente enzimas o fluoróforos, a partir de dos fragmentos inactivos fusionados a las proteínas de interés, si ambas se encuentran suficientemente próximas (Figura 13). Las técnicas de BiFC/BiLC presentan diversas ventajas sobre las técnicas de RET descritas anteriormente ya que el proceso de reconstitución produce una nueva señal fluorescente mientras que los métodos de RET producen cambios en la fluorescencia existente. Por otra parte, presenta algunas limitaciones debido principalmente al tiempo requerido de maduración del fluoróforo y a la posible asociación espontánea de los fragmentos bajo determinadas circunstancias.

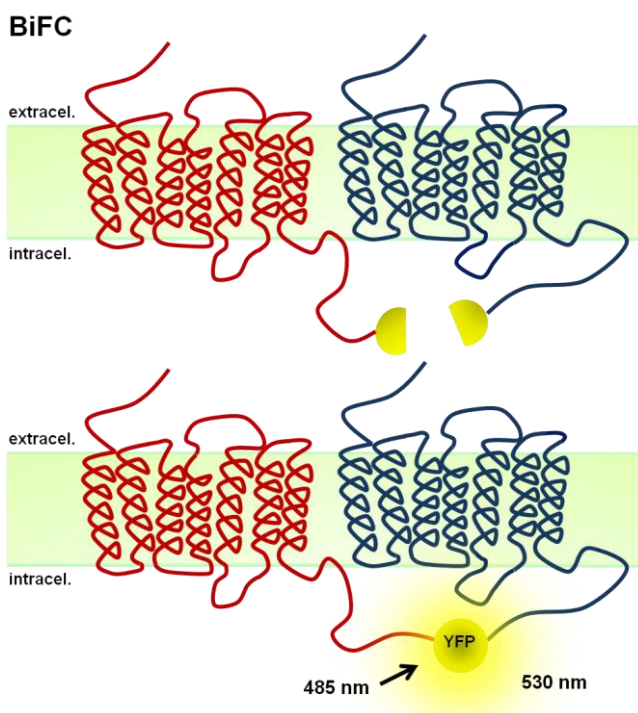


Figura 13. Representación esquemática del fenómeno de BiFC.

La combinación de las técnicas de BRET y FRET permite la caracterización de oligómeros de orden superior. Así, la técnica de RET secuencial (SRET) se basa en un primer proceso de BRET, en el que la emisión bioluminiscente por acción de la enzima *RLuc* fusionada al primer protómero es capaz de excitar a la proteína GFP² fusionada al segundo protómero, y la emisión de ésta es capaz de activar el segundo proceso de FRET, transfiriendo energía a la proteína YFP fusionada al tercer protómero del complejo (Figura 14). También se pueden combinar de manera secuencial técnicas de BiFC/BiLC con técnicas de RET, permitiendo la detección de estructuras triméricas y tetraméricas.

Esta combinación de técnicas ha permitido revelar la existencia del complejo formado por los receptores A_{2A} - D_2 - CB_1 y A_{2A} - D_2 -mGlu5 en células vivas (Cabello et al., 2009; Carriba et al., 2008; Navarro et al., 2008).

El principal problema asociado a estas técnicas biofísicas reside en su difícil implementación en tejidos nativos, debido a la necesidad de realizar una transfección que no se puede llevar a cabo en estas muestras, de manera que los datos reportados se limitan a sistemas de expresión heteróloga.

Las primeras evidencias de la oligomerización de GPCRs en sistemas fisiológicos se obtuvieron mediante la realización de experimentos de microscopía de fuerza atómica en membranas de discos nativos procedentes de ratón, que mostraron la reorganización de los GPCRs rodopsina en complejos diméricos paracristalinos (Fotiadis et al., 2003; Liang et al., 2003). A partir también de técnicas de microscopía, en este caso experimentos en que se mide la reflectancia total interna de una molécula única mediante microscopía de fluorescencia (TIR-FM), se monitorizó la posición individual de moléculas del receptor muscarínico de acetilcolina M_1 mediante ligandos fluorescentes, revelando la formación y disociación de los dímeros en una escala de segundos (Hern et al., 2010; Kasai et al., 2011). La combinación de la técnica TIR-FM con la tecnología SNAP-tag (método basado en la unión irreversible de la proteína reparadora del DNA O6-alkilguanina-DNA alquiltransferasa [AGT] con derivados de la O6-benzilguanina [BG], marcados selectivamente con fluoróforos) permite el marcaje directo de GPCRs con fluoróforos orgánicos con objeto de monitorizar la dinámica de los protómeros individuales a nivel de superficie celular en células transfectadas, como es el caso de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos así como receptores de $GABA_B$ (Calebiro et al., 2013). En este estudio se muestra que en cuestión de segundos se forman dímeros, trímeros y tetrámeros en función de la densidad de cada receptor, de manera que a densidades comparables con la expresión de estos receptores en tejidos nativos, las especies predominantes son los dímeros y los oligómeros de orden superior (Calebiro et al., 2013). Cabe destacar que cada receptor presenta su propia estequiometría, siendo un proceso de transición dinámica entre los diferentes complejos.

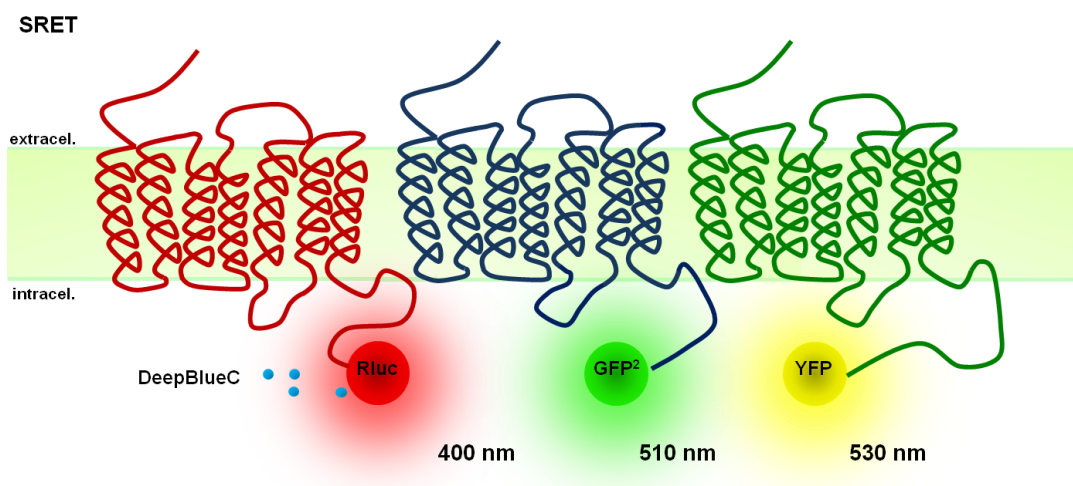


Figura 14. Representación esquemática del fenómeno de SRET.

Otra técnica indirecta para determinar el estado de los oligómeros formando *clusters* es la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), que mide las fluctuaciones en la intensidad de la fluorescencia a partir de proteínas individuales marcadas (Chen et al.,

2003). Así, se ha descrito la formación predominante de dímeros de receptores μ -opioides que oligomerizan con receptores δ -opioides para formar tetrámeros (Golebiewska et al., 2011), además de demostrar la expresión predominante en forma de homodímeros de muchos otros GPCRs.

Una muestra más es el uso de espectrometría cuantitativa por FRET, que permite controlar la expresión de las especies donadoras y que ha permitido demostrar que el receptor muscarínico M_3 existe como dímero estable y que una gran fracción interacciona de manera dinámica para formar tetrámeros con una organización específica en forma romboidal (Patowary et al., 2013).

Un ensayo desarrollado recientemente que provee una aproximación de la existencia de heterómeros en tejido nativo es el *Proximity Ligation Assay* (PLA). Esta técnica requiere el uso de anticuerpos primarios específicos de las dos proteínas a estudiar, juntamente con anticuerpos secundarios de especies distintas y conjugados con oligonucleótidos (sondas *minus* y *plus*). Cuando los anticuerpos están suficientemente próximos, las cadenas de DNA pueden hibridar y circularizar en presencia la enzima ligasa, amplificarse y visualizarse mediante sondas fluorescentes (Söderberg et al., 2006). La distancia máxima entre dos epítomos para obtener señal en un ensayo *in situ* de PLA es de 10 a 30 nm con anticuerpos primarios conjugados directamente con las sondas *minus* y *plus*, mientras que aumenta a 40 nm si se usan anticuerpos secundarios conjugados a estas sondas (Weibrecht et al., 2010). Esta distancia depende del tamaño de los receptores y de los anticuerpos así como de la longitud de las sondas. Se acepta que la técnica de PLA demuestra la heteromerización de GPCRs al permitir una validación *in vivo* de la proximidad molecular de dos GPCRs compatible con la interacción física y directa de ambos receptores.

Los esfuerzos más recientes se centran en el uso de anticuerpos monoclonales selectivos de heterómeros, al reconocer epítomos presentes solo en animales WT pero no en animales en los que se expresa uno de los dos protómeros del complejo (Gomes et al., 2013a, 2013b).

1.2.4. Relevancia funcional de la oligomerización de GPCRs

Los oligómeros presentan características tanto bioquímicas como funcionales únicas fruto de la combinación de moléculas a lo largo de la evolución y actualmente se las considera importantes dianas terapéuticas. De hecho, el posible papel de la heterodimerización de los GPCRs en la diversidad farmacológica se reportó por primera vez ya a finales de la década los 90, a partir de estudios con los receptores δ - y κ -opioides (Jordan and Devi, 1999).

La dificultad de establecer la relevancia funcional de este fenómeno común en la biología de los GPCRs yace en que gran parte de las evidencias que lo demuestran se han obtenido en sistemas de expresión heteróloga. La co-expresión artificial de receptores en células que no los co-expresan *in vivo* así como la expresión de elevados niveles de dichos receptores puede llevar a la observación de interacciones no fisiológicas. Aún así, actualmente se considera la oligomerización como una característica genérica de los receptores de membrana, compartida por los GPCRs ya que se ha demostrado su implicación tanto en ontogenia (maduración y transporte) como en internalización, además de ser un proceso clave para la modulación de la transducción de señales, la mediación del *crossstalk* entre vías de señalización, la regulación dinámica inducida por la unión de ligandos y la diversificación farmacológica existente (Milligan, 2009).

Su implicación en internalización puede tener importantes consecuencias funcionales, como así muestra el estudio de He y colaboradores sobre los receptores δ y μ -opioides; la activación del receptor δ -opioide induce la co-internalización del receptor μ -opioide, limitando de manera importante la analgesia producida por la morfina y asociada a la activación de los receptores μ -opioides (He et al., 2011).

La unión de ligandos puede modular la asociación o la separación de los componentes del oligómero presentes en la superficie celular, así como influir en la unión de otro ligando al segundo protómero del complejo. La acción de un ligando sobre un protómero formando parte de un complejo oligomérico puede variar en relación a su acción sobre el receptor individual, viéndose atenuado o potenciado su acoplamiento a una proteína G o incluso a otra proteína G distinta. Un claro ejemplo es el del heterómero de receptores CB_1 - D_2 , importante regulador de la función de los ganglios basales y atractiva diana terapéutica en desórdenes neuropsiquiátricos en los que la señalización dopaminérgica y/o cannabinoide está alterada. La activación individual de receptores CB_1 y D_2 inhibe la enzima AC (Meschler and Howlett, 2001), mientras que la activación conjunta o simplemente la co-expresión de ambos receptores en células estriatales en cultivo cambia el acoplamiento de proteína $G_{i/o}$ a proteína G_s (Jarrhian et al., 2004). Kern y colaboradores observaron un comportamiento similar al observado con la estimulación de AC pero a nivel de activación de la vía de las MAPKs (Kern et al., 2005). Así, la co-expresión de ambos receptores incrementa la fosforilación de ERK1/2 mediada por CB_1 pero no por D_2 y este incremento es independiente al tratamiento con toxina *pertussis*, no así en células transfectadas con un único receptor. La co-expresión de ambos receptores da lugar, pues, a un acoplamiento del heterómero a proteína G_s en vez de a proteína $G_{i/o}$ (Kern et al., 2005). Los multímeros u oligómeros de orden superior constituyen una muestra más de la potencial expansión de la diversificación farmacológica y funcional asociada a la formación de complejos macromoleculares. En ellos se pueden observar los mismos fenómenos descritos para los complejos dimericos pero con un grado superior de complejidad, teniendo en cuenta que los cambios en el perfil farmacológico de un receptor dependen tanto de la presencia como de la activación de los demás receptores del complejo. Los cambios en las respuestas asociadas a las vías de señalización dependen de los receptores del complejo, el grado de activación y la naturaleza de las proteínas G expresadas en el plano molecular (Terrillon and Bouvier, 2004).

Teniendo en cuenta los múltiples procesos descritos en los que la oligomerización de GPCRs juega un papel importante, actualmente muchos esfuerzos se centran en el estudio de la selectividad funcional y en la descripción de ligandos agonistas y antagonistas *biased*, además de en la exploración de distintas aproximaciones con la finalidad de desarrollar ligandos dirigidos de manera selectiva hacia heterómeros de receptores, sean compuestos dirigidos a uno de los receptores del complejo (Waldhoer et al., 2005) o ligandos bivalentes que puedan interactuar simultáneamente y específicamente con ambos receptores de la entidad (Daniels et al., 2005).

1.3. Sistema orexinérgico

La identificación de las orexinas/hipocretinas a finales de la década de los 90 fue el resultado de la convergencia de los estudios de dos grupos de investigación distintos mediante metodologías totalmente diferentes. Así, Lecea et al. (de Lecea et al., 1998)

predijeron, a partir de su secuencia primaria o prepro-hipocretina, la expresión de dos péptidos estructuralmente relacionados entre sí, a los que llamaron hipocretina-1 e hipocretina-2 por su expresión hipotalámica y su similitud con el péptido secretina. Paralelamente, Sakurai et al. (Sakurai et al., 1998) identificaron dos péptidos (orexina-A y orexina-B) como ligandos endógenos de dos GPCRs huérfanos, el receptor de orexina 1 (OX₁) y el receptor de orexina 2 (OX₂). Ambos péptidos procedían de la rotura de un precursor polipeptídico común, la prepro-orexina, expresado de manera selectiva en una población de neuronas alrededor del área hipotalámica perifornical (PFA). Fue más adelante cuando se vio que los precursores prepro-hipocretina y prepro-orexina eran idénticos y que los péptidos orexina-A y B correspondían a los péptidos hipocretina-1 y 2, respectivamente.

La síntesis exclusiva de ambos péptidos en el hipotálamo lateral (LH), área implicada en el control de la ingesta, así como la observación que la administración de orexina-A o B vía intracerebroventricular (icv) aumentaba la ingesta de manera dosis-dependiente en ratas, llevó a describirlos inicialmente como péptidos relacionados con la ingesta. Además de su efecto en ingesta, se ha descrito su implicación en gran variedad de respuestas fisiológicas, tales como los estados de sueño/vigilia, estado de alerta, regulación neuroendocrina, control autónomo y actividad locomotora (Li et al., 2014).

La cuestión crítica es saber si los efectos farmacológicos reportados son o no debidos a las funciones endógenas de la neuronas orexinérgicas en condiciones fisiológicas. Su papel en la regulación de los estados de sueño/vigilia está fuertemente secundado por diferentes aproximaciones. El efecto farmacológico inicialmente reportado a nivel de estimulación de la ingesta provoca ciertas discrepancias, discutiéndose si el incremento de la ingesta es o no secundario a un incremento de los estados de vigilia y de consecuente actividad (Taheri et al., 2002). Diversas evidencias muestran que las neuronas orexinérgicas pueden actuar como sensores de indicadores del balance energético, tales como la glucosa o la leptina (Cai et al., 2001; Yamanaka et al., 2003). El sistema orexinérgico no solo promueve los estados de vigilia sino que también regula los sistemas autónomo y endocrino, de manera que estas condiciones fisiológicas permanecen coordinadas ante demandas externas o internas que requieren comportamientos de vigilancia y ejecución.

El sistema orexinérgico parece tener múltiples activadores y dianas de acción. El objetivo es responder cuáles son las interacciones con otros sistemas y qué papel juega la heterogeneidad dentro del propio sistema.

1.3.1. Orexinas y receptores de orexina

Las orexinas constituyen una familia en sí mismas, sin homología significativa con ningún otro péptido descrito con anterioridad. La orexina-A es un péptido de 33 aminoácidos cuya estructura presenta 4 Cys que forman dos cadenas internas unidas por puentes disulfuro, estructura completamente conservada en diversas especies de mamíferos. Mientras la orexina-B, por su parte, presenta una estructura de 28 aminoácidos y un 46% de homología con la orexina-A. Ambos péptidos provienen de la proteólisis de un mismo precursor, el polipéptido prepro-orexina, codificado por el gen *prepro-orexina* localizado en el cromosoma 17q21 en humanos. Su regulación permanece incierta, aunque se ha descrito una sobreexpresión de estos péptidos en condiciones de ayuno, indicando que las

neuronas orexinérgicas pueden de alguna manera percibir el balance energético del animal (Sakurai et al., 1998).

Las orexinas son neuropéptidos sintetizados en una pequeña región del sistema SNC, desde el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH) al PFA del área hipotalámica lateral (LHA), y las neuronas que los contienen presentan un patrón de proyección difuso a todo el cerebro y la médula espinal. En los terminales de estas neuronas, las orexinas interactúan con dos receptores tipo GPCR, el receptor OX_1 y el receptor OX_2 . Se han identificado dos genes en diversas especies de mamíferos que codifican para estos dos receptores. Se ha descrito que el ratón doble deficiente para OX_1 y OX_2 presenta un estado anormal del sueño, indistinguible del ratón deficiente para el gen que codifica para la prepro-orexina. Estos resultados, sugieren que solo existen estos dos receptores para las orexinas, al menos a nivel de control del estado de sueño/vigilia. Sin embargo, si sería posible la existencia de otros tipos de receptores generados por *splicing* alternativo a partir de los genes para OX_1 y OX_2 .

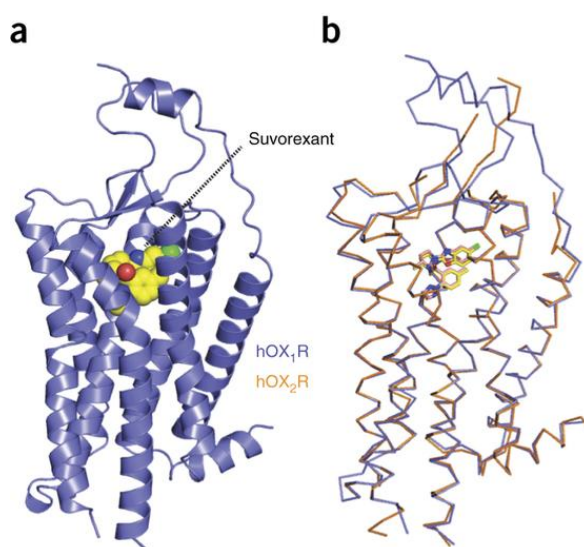


Figura 15. Estructura del receptor OX_1 humano unido al antagonista suvorexant. (A) Estructura global del receptor hOX₁ (azul) unido a suvorexant (amarillo) y (B) superposición del receptor hOX₁-suvrexant (azul-amarillo) con el receptor hOX₂-suvrexant (naranja). (Extraído de Yin et al., 2016)

Los receptores OX_1 y OX_2 mantienen una identidad de secuencia del 64% entre sí (Figura 15). La gran homología existente entre especies indica que los dos genes que los codifican se encuentran altamente conservados. OX_1 une orexina-A y orexina-B aunque tiene menor afinidad por orexina-B, mientras que OX_2 puede unir ambos péptidos con una alta afinidad similar. Las afinidades de ambos péptidos por el receptor OX_1 fueron determinadas mediante ensayos de desplazamiento de [¹²⁵I-Tyr¹⁷]orexina-A, de manera que la concentración de péptido frío necesario para desplazar el 50% de radioligando unido (IC_{50}) es de 20 nM para la orexina-A y de 420 nM para la orexina-B. Por su parte, para el receptor OX_2 , tanto la orexina-A como la orexina-B muestran un valor de IC_{50} de 20 nM, siendo por tanto ambos neuropéptidos no selectivos para el receptor OX_2 .

Ambos receptores pertenecen a la familia de los GPCRs. Una vez interactúan con sus propios ligandos, transmiten la información al interior celular mediante la activación de la proteína trimérica G. OX_1 une $G_{q/11}$ mientras que OX_2 puede unir $G_{q/11}$ o $G_{i/o}$; si bien, el acoplamiento a proteínas G alternativas ha sido reportado para ambos receptores (Kukkonen and Leonard, 2014). La activación de diferentes vías de señalización asociadas a diferentes proteínas G contribuye a la gran diversidad de efectos farmacológicos de las orexinas en neuronas particulares, así como a la potencial modulación de canales de calcio dependientes de voltaje (OX_1 y OX_2) y de *G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels* (GIRK).

Mientras las orexinas se producen en una región discreta del hipotálamo, sus receptores se expresan en muchas y muy diversas regiones del cerebro y la médula espinal, aunque con un patrón selectivo y poco solapado. De hecho, desde el área hipotalámica lateral, considerada un centro de integración y comandancia de numerosos sistemas homeostáticos, autónomos, endocrinos y comportamentales, parten fibras orexinérgicas que proyectan a todo el eje neural desde la corteza hasta la médula espinal, en un patrón difuso consistente con la implicación en gran variedad de sistemas fisiológicos. Estudios con trazadores retrógrados y anterógrados han mostrado que el área hipotalámica lateral es la primera diana de proyecciones, posiblemente conteniendo información visceral, procedentes del tronco del encéfalo, con un patrón recíproco descendente a estas regiones (ter Horst et al., 1984). El LHA también inerva y es inervada por la corteza e inerva regiones de control neuroendocrino en el hipotálamo como el núcleo arcuato (ARC) y el núcleo hipotalámico paraventricular (PVN) (Stuber and Wise, 2016).

Numerosos estudios han reportado la localización de fibras orexinérgicas mediante técnicas inmunohistoquímicas (Cutler et al., 1999; Nambu et al., 1999; Peyron et al., 1998) y otros muchos han detallado la expresión del mRNA de los receptores de orexina mediante hibridación *in situ* (Marcus et al., 2001) e inmunohistoquímica (Cluderay et al., 2002; Suzuki et al., 2002). En general, los estudios son consistentes entre sí, de manera que las áreas que reciben una densa inervación de fibras orexinérgicas también presentan elevados niveles de expresión del mRNA de los receptores. Así, en la corteza encontramos una proyección extendida pero difusa, con bajos niveles en las diferentes capas corticales, una cantidad moderada de fibras en el bulbo olfatorio anterior o ausencia en caudado, putamen y globo pálido pero un número moderado en núcleo accumbens (NAc) medial (Marcus and Elmquist, 2006). Fibras orexinérgicas inervan densamente el núcleo septal medial y lateral, y de manera difusa se extienden por el hipocampo y ciertas regiones de la amígdala, así como del tálamo. Regiones del mesencéfalo, prosencéfalo y médula espinal reciben una densidad similar de fibras; descendiendo caudalmente desde el hipotálamo, se extienden de manera moderada hacia el área ventral tegmental (VTA), en la que encontramos niveles importantes del mRNA de ambos receptores.

1.3.2. Papel fisiológico de los receptores de orexina

El papel fisiológico de las orexinas en el LHA se ha ido mostrando históricamente mediante estudios de lesión y estudios de estimulación eléctrica (Sakurai, 2006). Así, animales con lesiones en el LHA muestran hipofagia y una tasa metabólica aumentada, mientras estudios de estimulación eléctrica de la región muestran que la estimulación aguda causa hiperfagia y la estimulación crónica se ha relacionado con la obesidad. A raíz de estos resultados, múltiples estudios han mostrado al LHA como un importante centro de control de la ingesta para la regulación de la homeostasis, y las orexinas, como sustancias clave en los comportamientos relacionados con la ingesta, la regulación neuroendocrina y metabólica y el control autónomo. La administración icv de orexina-A estimula la ingesta de manera dosis-dependiente durante 4 horas, así como también la de orexina-B aunque con un efecto más corto en el tiempo, probablemente debido a la relativa inestabilidad de la orexina-B en líquido cerebroespinal en relación con la orexina-A. Las neuronas orexinérgicas son capaces de monitorizar indicadores humorales y neurales del balance energético; cambios en la concentración extracelular de glucosa se relacionan con cambios electrofisiológicos en estas neuronas. Así, aumentos en la concentración extracelular de glucosa así como de leptina producen una notable hiperpolarización y el cese de los

potenciales de acción en las neuronas orexinérgicas. Mientras, una disminución de la concentración de glucosa induce despolarización a la vez que aumenta la frecuencia de potenciales de acción en estas mismas neuronas (Burdakov et al., 2005). Además, el mRNA de prepro-orexina aumenta en condiciones de ayuno (Sakurai et al., 1998) y en condiciones de hipoglicemia, sugiriendo que el gen también se encuentra regulado por los niveles de glucosa en plasma (Griffond et al., 1999; Moriguchi et al., 1999). En este contexto, la expresión del gen *prepro-orexina* en ratones normales y en ratones *ob/ob* (ratones obesos por mutación en el gen de la leptina) se correlaciona de manera negativa con disminuciones en los niveles de glucosa y leptina en plasma y con la ingesta (Yamanaka et al., 2003).

El papel fisiológico del sistema orexinérgico también ha sido fuertemente relacionado con los sistemas centrales que controlan los estados de sueño/vigilia. Hoy en día sabemos que las neuronas orexinérgicas promueven el estado de vigilia y de hecho su pérdida en roedores conlleva un fenotipo narcoléptico (Beuckmann et al., 2004; Chemelli et al., 1999; Hara et al., 2001), y en humanos narcolépticos los niveles de orexina A en líquido cefalorraquídeo son indetectables (Nakamura et al., 2011). Un ejemplo claro de esta relación es el fármaco modafinilo, un neuroestimulante indicado para el tratamiento de la somnolencia excesiva diurna asociada a la narcolepsia, que aumenta notablemente los niveles de expresión de Fos en neuronas orexinérgicas (Chemelli et al., 1999). Los niveles de orexina oscilan circadianamente, siendo máximos durante la vigilia y aumentando como consecuencia de la privación forzada de sueño (Yoshida et al., 2001). Esto sugiere que las orexinas y la actividad de las neuronas orexinérgicas actúan oponiéndose al sueño. El aumento durante la vigilia forzada puede estar indicando que el sistema orexinérgico tiene una actividad promotora de la vigilia incluso cuando el sueño es una necesidad, o puede ser el resultado de elevados niveles de estrés consecuencia de los tratamientos de privación.

Las neuronas orexinérgicas proyectan a diversas estructuras del tronco encefálico pertenecientes al sistema activador ascendente reticular, que expresan uno o los dos receptores de orexina y están implicados en la regulación del estado de vigilia. El grupo de células REM-off incluye neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC), neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe y neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar (TMN); cada uno de estos grupos neuronales dispara rápidamente durante la vigilia, lentamente durante el sueño de ondas lentas y nada durante el sueño REM (Berridge and Waterhouse, 2003). Un modelo de la función de las orexinas en la vigilia muestra la excitación del grupo de células REM-off durante la vigilia, probablemente por señalización a través de los receptores OX_1 y OX_2 , que contribuyen directamente a su vez al despertar del prosencéfalo.

Existe una clara e imprescindible relación entre estos dos papeles protagonistas de las orexinas. El mantenimiento del estado de vigilia mediado por orexinas es importante en los comportamientos relacionados con la ingesta, ya que los estados de vigilancia durante la búsqueda de comida y la ingesta son esenciales para la supervivencia. Cuando la energía almacenada es baja, el sistema orexinérgico puede adaptarse para alargar el periodo de vigilia, proveyendo al individuo de más tiempo para buscar comida. En esta misma línea, el ratón transgénico que no presenta neuronas orexinérgicas no puede responder al ayuno con el habitual incremento de la actividad locomotora y el periodo de vigilia que sí se observa en el ratón WT (Yamanaka et al., 2003).

Más recientemente, se ha relacionado a la orexina con el sistema de recompensa y los trastornos por uso de sustancias de abuso (Sakurai, 2014). En este sentido, este efecto se encuentra asociado específicamente con neuronas orexinérgicas del hipotálamo lateral, pero

no con el PFA ni con el DMH. Por el contrario, la implicación del sistema orexinérgico en la vigilia y el estrés está más relacionada con la activación de las neuronas del PFA y el DMH, hecho que permite proponer una dicotomía funcional entre las poblaciones de neuronas orexinérgicas (Harris and Aston-Jones, 2006). Otra dicotomía en la función de las orexinas se relaciona con sus receptores; el receptor OX_2 se asocia con la regulación de los estados de vigilia (Akanmu and Honda, 2005; Willie et al., 2003), mientras el receptor OX_1 se asocia con los procesos de recompensa (Aston-Jones et al., 2010; Smith et al., 2009).

Las orexinas también están implicadas en la regulación de la función autónoma y la activación nerviosa simpática. La inyección icv de orexinas aumenta la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca. En este sentido, se ha descrito que la presión sanguínea en ratones deficientes en orexinas es de 10 a 15 mmHg inferior a la de los ratones WT (Zhang et al., 2006a).

En último lugar, también se ha relacionado a las orexinas con la función neuroendocrina, de manera que su inyección icv estimula el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, afectando los estados de vigilancia y la respuesta al estrés (Kuru et al., 2000), además de activar las neuronas que expresan CRF en el PVN y en el núcleo de la amígdala central (CeA) (Sakamoto et al., 2004).

1.4. Ingesta y homeostasis energética

La ingesta y el consumo de energía están controlados por sistemas neurales complejos y redundantes, ampliamente distribuidos y que implican el reclutamiento de múltiples genes. En las últimas dos décadas se ha avanzado notablemente en la identificación del importante papel del hipotálamo y el tronco encefálico vía núcleo caudal del tracto solitario (NTS) en diversos mecanismos hormonales y neurales, por los que el cerebro se mantiene informado sobre la disponibilidad de nutrientes ingeridos y almacenados, generando a su vez respuestas de comportamiento, autónoma y endocrinas consecuentes.

El hipotálamo es el centro clave para la integración de la información nutricional originada en la periferia y mediada a través de hormonas y metabolitos circulantes, además de vías neurales procedentes principalmente del tronco encefálico. De hecho, animales con lesiones en el LH exhiben una menor ingesta mientras que la estimulación eléctrica del LH durante estados de saciedad promueve la ingesta (Bernardis and Bellinger, 1996). Además de la información nutricional, el hipotálamo también se encuentra involucrado en los comportamientos relacionados con la motivación, termorregulación, homeostasis, reproducción y agresividad-defensa. Las respuestas adaptativas óptimas generadas finalmente son ejecutadas a través de *outputs* comportamentales, autónomos y endocrinos originados en el PVN y el LH.

Los centros hipotalámicos asociados con la regulación del balance energético incluyen el LHA y los núcleos hipotalámicos ARC, DMH, PVN y ventromedial (VMN). Entre ellos, el ARC es el lugar clave de la regulación de la ingesta, al integrar las señales procedentes del tronco encefálico y la periferia (Cone et al., 2001; Cowley et al., 2003). Al menos dos poblaciones de neuronas de primer orden controlan el apetito en el ARC: por un lado, las neuronas que co-expresan los potentes péptidos orexigénicos neuropéptido Y (NPY) y *agouty-related peptide* (AgRP), que estimulan la ingesta (Broberger et al., 1998), y por el otro, las neuronas que co-expresan los péptidos anorexigénicos pro-opiomelanocortina (POMC)

y *cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART), que la reprimen (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998) (Figura 16). Ambas poblaciones son, de manera directa y diferencial, sensibles a la leptina circulante, a hormonas como la grelina y la insulina y a metabolitos circulantes como la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos.

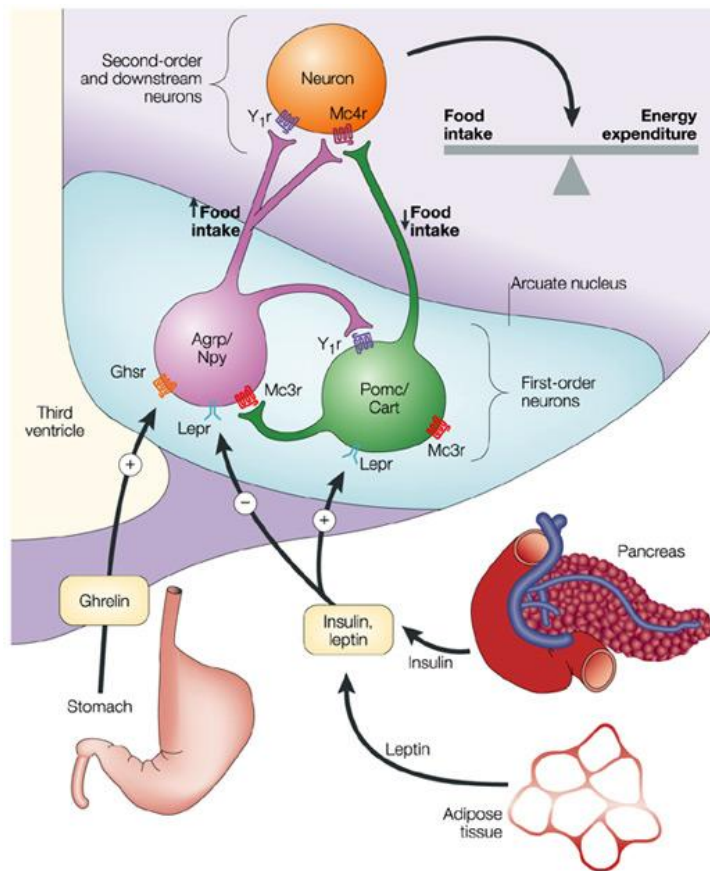


Figura 16. Control de la homeostasis energética por parte de las neuronas del ARC hipotalámico. (Extraído de Barsh y Schwartz, 2002).

El lugar de proyección principal desde el ARC son poblaciones de neuronas de segundo orden en el LHA y el PVN, dos regiones clásicamente asociadas con el control de la ingesta y el *output* autónomo. Las neuronas en el LHA contienen numerosos péptidos relacionados con la regulación de la ingesta, incluyendo orexinas, hormona concentradora de melanina, CART, neurotensina e histamina. Actualmente el modelo aceptado muestra como el *input* procedente de la población NPY/AgRP es opuesto por el de las neuronas que expresan POMC, y que esta información es integrada conjuntamente con los *inputs* procedentes de otras áreas cerebrales, proyectando *downstream* a neuronas de tercer orden ampliamente distribuidas por el cerebro y la médula espinal (Berthoud, 2002).

1.4.1. Orexinas y comportamientos asociados con la ingesta

La relevancia funcional de las orexinas se ha relacionado clásicamente con el control de los estados de sueño/vigilia además de con el control de la ingesta y la regulación de la homeostasis energética. De hecho, pacientes narcolépticos presentan una menor ingesta calórica aunque un mayor índice de masa corporal, indicando que el mal funcionamiento del sistema orexinérgico que subyace al estado narcoléptico se relaciona también con una disminución del consumo energético o una menor tasa metabólica (Lammers et al., 1996; Schuld et al., 2000).

Se ha descrito que la administración icv de un anticuerpo anti-orexina o del antagonista selectivo del receptor OX₁, SB-334867, reducen la ingesta (Haynes et al., 2000; Yamada et al., 2000). Además de reducir la ingesta, el antagonista SB-334867 también reduce el grado de obesidad en ratones *ob/ob* deficientes en leptina (Haynes et al., 2002). En la misma línea, el ratón *knockout* (KO) para prepro-orexina así como el ratón transgénico que carece de las neuronas orexinérgicas comen menos que el ratón WT (Hara et al., 2001; Willie et al., 2001).

Ante el imparable crecimiento de la obesidad como epidemia (según el último estudio de la OMS en 2014, el 39% de la población adulta sufre sobrepeso y el 13%, obesidad) actualmente, numerosos estudios se centran en la implicación de las orexinas en el control de la ingesta relacionada con recompensas. La alimentación puede verse influenciada por hábitos y preferencias y, como las drogas de abuso, recluta circuitos cerebrales encargados de regular la motivación a recompensas naturales como la comida (Kelley and Berridge, 2002; Volkow and Wise, 2005). La disfunción del sistema orexinérgico puede ser un factor que contribuya a la sobreingesta asociada con la obesidad. Este hecho es plausible teniendo en cuenta el solapamiento de los circuitos neuronales implicados en la ingesta y en la recompensa por consumo de drogas, y la comunicación entre el hipotálamo y los núcleos del tronco encefálico que controlan los procesos homeostáticos así como con áreas corticales y límbicas asociadas con la motivación.

El mantenimiento del estado de vigilia mediado por orexinas es importante en los comportamientos relacionados con la ingesta, ya que los estados de vigilancia durante la búsqueda de comida y la ingesta son esenciales para la supervivencia. De hecho, ante una reducción de la comida disponible, los animales se adaptan para tener un periodo de vigilia más prolongado, provocando cambios en los patrones normales de actividad circadiana. La actividad de las orexinas también contribuye a la promoción y el mantenimiento de la actividad anticipatoria a la comida (FAA) (Akiyama et al., 2004). La restricción alimentaria diaria muestra el pico de expresión de Fos en las neuronas orexinérgicas durante la mañana, cuando el acceso al alimento se encuentra restringido, indicando que dichas neuronas están activas cuando el animal necesita estar despierto y buscar comida (Yamanaka et al., 2003). Además de esta relación entre el papel fisiológico clásico atribuido a las orexinas, numerosas evidencias apoyan el papel de estos neuropéptidos en la búsqueda de comida y la ingesta, que implica mayoritariamente alimentos de alta palatabilidad, es decir, aquellos alimentos cuyos efectos se asocian principalmente al sobreconsumo, alimentación hedónica e ingesta no homeostática. Además, también se las ha relacionado con la búsqueda de comida derivada de señales condicionadas (Stuber and Wise, 2016) de manera que el papel de las orexinas en la búsqueda de comida se sugiere paralelo a su papel en la búsqueda de drogas de abuso.

Una prueba más de la relación entre las orexinas y la motivación relacionada con la ingesta la encontramos en el NAc. Sabemos que los patrones de liberación de dopamina difieren entre la zona central (*core*) y la corteza (*shell*) del NAc, relacionándose el *shell* con el procesamiento cognitivo de la percepción de la recompensa y el *core*, con el procesamiento motor relacionado con la recompensa y el refuerzo. Estudios recientes muestran como la infusión de orexina-A en el NAc *shell* aumenta la ingesta (Thorpe and Kotz, 2005). Además, la infusión del agonista del receptor de GABA_A, muscimol, en el NAc *shell* induce fuertemente la ingesta y, a su vez, incrementa la expresión de Fos en neuronas orexinérgicas (Baldo et al., 2004). Estos resultados indican que las interacciones recíprocas entre las orexinas y los sistemas límbicos tienen un papel importante en la regulación de la ingesta.

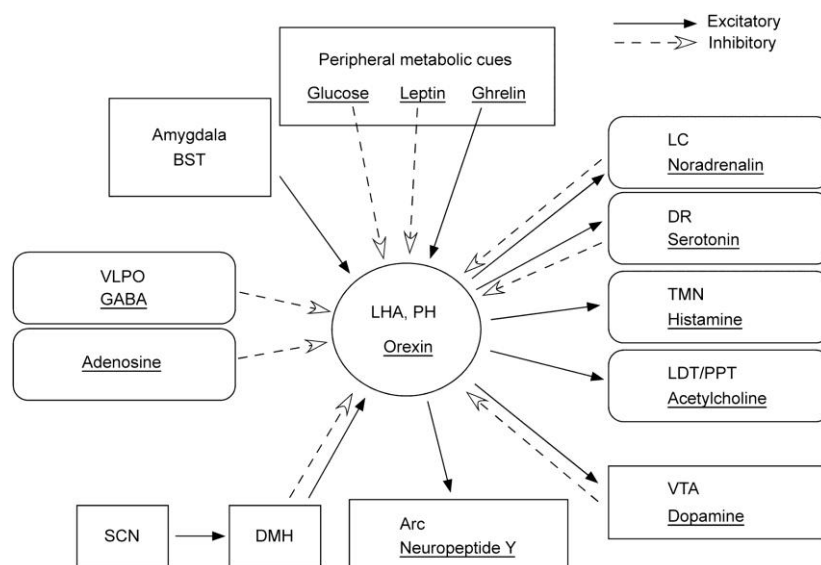


Figura 17. Esquema de los inputs y outputs de las neuronas orexinérgicas en la interfase del sueño/vigilia, sistema de recompensa y homeostasis energética. (Extraído de Nishino y Sakurai, 2009)

En la misma línea, la administración icv de orexina-A no altera la ingesta en ratas con alimentación libre, mientras sí aumenta el momento de cese de respuesta a sacarosa bajo una relación progresiva (PR), que en el paradigma de auto-administración se relaciona con un aumento en la motivación por conseguir la sustancia adictiva (Choi et al., 2010). Esta evidencia, entre otras, apoya la hipótesis de que las orexinas afectan de manera preferencial la ingesta relacionada con recompensas. Pero no únicamente, ya que a dosis altas la administración de orexina-A icv sí es capaz de aumentar la ingesta en animales con alimentación *ad libitum* (Choi et al., 2010; Sakurai et al., 1998).

Así pues, las orexinas se encuentran implicadas en la motivación, la recompensa y el refuerzo en la ingesta y en los comportamientos asociados a esta. Este sistema es complejo y requiere de la integración de múltiples señales tanto centrales como periféricas así como de la implicación de estructuras diversas (Figura 17).

1.4.2. Grelina: péptido y receptores

La hormona del crecimiento (GH) es una hormona multifuncional secretada por la glándula pituitaria anterior que regula de manera global el crecimiento corporal y celular, el metabolismo de glúcidos, lípidos y proteínas así como el balance electrolítico (Carter-Su et al., 1996). Su liberación es inhibida por la somatostatina mientras que es estimulada por la hormona hipotalámica liberadora de GH (GHRH) (Müller et al., 1999). Además, se conoce una vía independiente, activada por compuestos sintéticos llamados secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS), que actúan a través del receptor GHS-R, que estimula y amplifica la liberación pulsátil de GH, en este caso a nivel hipotalámico y de la glándula pituitaria.

El receptor de ghrelina (GHS-R) fue identificado inicialmente como la diana de acción de los GHS y no fue hasta 1999 cuando Kojima y colaboradores identificaron su ligando endógeno, un péptido de 28 aminoácidos, purificado a partir de muestras de estómago de rata, al que llamaron *ghrelina* (Kojima et al., 1999). El GHS-R, fue clonado por primera vez en 1996 por Howard y colaboradores en pituitaria y hipotálamo humanos (Howard et al., 1996).

El gen que codifica para el GHS-R se encuentra localizado en el cromosoma 3q26.2 humano y codifica para dos transcritos: GHS-R1a y GHS-R1b. El receptor GHS-R1a es una proteína de 366 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 41 KDa (Howard et al., 1996) y una típica estructura de siete dominios transmembrana, con un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular. En los bucles extracelulares 2 y 3 se encuentran dos residuos de cisteína (Cys116 y Cys198) evolutivamente muy conservados que forman un puente disulfuro esencial para la unión y activación de los procesos fisiológicos (Palyha et al., 2000). Por su parte, la proteína GHS-R1b es fruto de un proceso de *splicing* alternativo (McKee et al., 1997) y está formada únicamente por 298 aminoácidos, los cinco primeros dominios transmembrana, y una cola de 24 aminoácidos. A diferencia del receptor GHS-1a, GHS-1b no une ni responde ni a grelina ni a los GHS (Smith et al., 1997), teniendo un papel importante como modulador endógeno de la actividad constitutiva de GHS-1a.

A nivel de señalización, GHS-1a se acopla de manera preferencial a la proteína $G_{q/11}$, induciendo la activación de PLC, IP3 y movilización el Ca^{2+} intracelular (Damian et al., 2015; Holst et al., 2005). Aún así, también se ha descrito el acoplamiento de este receptor a la proteína $G_{i/o}$ (Bennett et al., 2009; Dezaki et al., 2007).

La grelina es el ligando endógeno del receptor GHS-1a, sintetizado principalmente por las células endocrinas tipo X/A de la mucosa gástrica del estómago proximal (Date et al., 2000; Dornonville de la Cour et al., 2001), y en menor medida, en el ARC hipotalámico (Kojima et al., 1999; Lu et al., 2002). La grelina es la única hormona peptídica descrita hasta el momento que presenta una modificación post-traduccional por un ácido graso; el 90% de la grelina circulante es desacil-grelina mientras que tan solo el 10% es acil-grelina, siendo el grupo acil esencial para su unión con el receptor GHS-R1a (Patterson et al., 2005). Además de en el estómago, la grelina se expresa en múltiples tejidos tanto centrales como en periféricos, incluyendo el duodeno, yeyuno, íleon, colon, pulmones, corazón, páncreas, hígado, testículos, glándula pituitaria e hipotálamo (Ghelardoni et al., 2006; Gnanapavan et al., 2002).

La grelina ejerce una gran cantidad de funciones fisiológicas en todo el organismo, incluyendo la secreción de GH, la estimulación del apetito y la ingesta, la modulación de la secreción y la motilidad gástricas y la modulación de las secreciones pancreáticas endocrinas y exocrinas. También se ha descrito su participación en funciones cardiovasculares, anti-inflamatorias e incluso reproductivas y de formación ósea.

El receptor de grelina, igual que la propia hormona, se encuentran ampliamente distribuidos por el SNC, haciendo mención especial del LH y el ARC (Howick et al., 2017). Se ha descrito una fuerte expresión del mRNA del receptor en múltiples núcleos hipotalámicos, incluyendo los núcleos VMN, PVN y ARC, así como una expresión más difusa en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria (Howick et al., 2017). La detección de la expresión del receptor en estos centros de control neuroendocrino es consistente con su papel regulador de la función de la GH. Estas áreas contienen diversas subpoblaciones de neuronas que producen diferentes neuropéptidos implicados en la regulación de la ingesta. La administración central de grelina puede interactuar con dichos péptidos, estando relacionada su actividad como hormona orexigénica en las vías dependientes de NPY y AgRP (Howick et al., 2017; Shintani et al., 2001).

Se ha descrito que la administración icv de grelina estimula de manera independiente la secreción de GH y la ingesta, debido a que ratas deficientes para esta hormona muestran el

mismo efecto a nivel de ingesta (Howick et al., 2017; Shintani et al., 2001). El mRNA del receptor de grelina se expresa en neuronas del ARC que expresan NPY/AgRP; la administración central de grelina induce la expresión del gen temprano *c-fos* en aproximadamente un 40% de éstas neuronas además de incrementar los niveles de mRNA de ambos péptidos (Howick et al., 2017; Shintani et al., 2001). Además, fibras que contienen grelina proyectan al LH estableciendo sinapsis con neuronas inmuno-reativas para orexina; la administración icv de grelina induce la expresión de Fos en neuronas que expresan orexina incluso con un tratamiento previo de IgG anti-NPY, sugiriendo que la grelina activa las neuronas que contienen orexina de una manera independiente a NPY. En conjunto, estos datos sugieren que la grelina estaría estimulando la ingesta tanto a través del sistema orexinérgico como del sistema NPY/AgRP.

Los comportamientos relacionados con la ingesta implican la integración compleja de un elevado número de eventos relacionados con la memoria, las emociones y el aprendizaje, y estados cognitivos, somatosensoriales y autonómicos. La administración central de grelina puede regular la ingesta y la homeostasis energética a través de la activación directa de las vías orexigénicas y de NPY/AgRP, o influenciando el aprendizaje y la memoria, el estado de ánimo y la formación de las emociones.

1.4.3. Leptina: hormona y receptores

En 1950, los laboratorios Jackson reportaron la existencia del primer ratón obeso (*ob/ob* o *Lep^{ob}*) que presentaba hiperfagia masiva, un aumento de grasa corporal y leves síntomas de diabetes (Ingalls et al., 1950). En 1966, Coleman y colaboradores reportaron un nuevo ratón transgénico (*db/db* o *Lep^{db}*) con hiperfagia marcada, obesidad y graves síntomas de diabetes como hiperglicemia, poliuria y glicocuria (Hummel et al., 1966). Los mismos investigadores identificaron que, mientras el ratón *Lep^{db}* producía niveles elevados de un factor circulante para el que no podían responder, los ratones *Lep^{ob}* sí que podían responder, aunque eran incapaces de sintetizar dicho factor (Coleman, 1973; Coleman and Hummel, 1969). No fue hasta 1994 cuando el grupo de Friedman, mediante técnicas de clonación posicional, clonó este factor, al que llamaron “leptina” (Zhang et al., 1994).

La leptina es una hormona de 16KDa producto del gen *obesity* (*ob*), sintetizada principalmente en el tejido adiposo blanco (Zhang et al., 1994) y secretada después a la circulación, aunque también se expresa en otros tejidos, como el estómago, los pulmones, la placenta e incluso posiblemente en el cerebro (Zhang et al., 2005). Forma parte del extenso grupo de más de 50 miembros identificados de adipocitoquinas, que participan en la señalización hormonal del tejido adiposo (Koerner et al., 2005) aunque presenta efectos pleiotrópicos al regular también la respuesta inmune (Matarese et al., 2005), la función gonadal (Chan and Mantzoros, 2001) y las respuestas al estrés (Roubos et al., 2012). Desde su identificación, la leptina se ha convertido en un importante foco de atención, al ser considerada una de las señales centrales y periféricas más importantes para el mantenimiento de la homeostasis energética y, por tanto, el mejor indicador para la obesidad (Zhang et al., 2005).

A nivel de tejido adiposo, la leptina es secretada de manera continua a la circulación y, teniendo en cuenta la presencia de pequeñas vesículas almacenadas en los adipocitos, la tasa de secreción se hace independiente de la regulación de la expresión del mRNA (Ye et al., 2010). La estimulación prolongada y sostenida de la secreción sí que requiere, en cambio,

1. Introducción

un aumento simultáneo en la expresión del mRNA para prevenir así el agotamiento de la leptina almacenada (Barr et al., 1997). Así, se observan niveles continuados de leptina en plasma en el rango nanomolar (de 5 a 15 ng/mL) (Cummings et al., 2001). Además, la leptina puede cruzar la barrera hematoencefálica (Banks et al., 1996), actuando en centros de control de la ingesta y modulando la eficacia de las sustancias orexigénicas. La expresión de leptina está regulada positivamente por los niveles de insulina circulantes (Barr et al., 1997), la recaptación de glucosa celular (Mueller et al., 1998) y la disponibilidad de sustratos energéticos (Cammisotto et al., 2005), mientras la expresión y la liberación de leptina está inhibida en los estados postprandiales (Boden et al., 1996) y por la exposición a temperaturas frías (Ricci et al., 2000) entre otros factores.

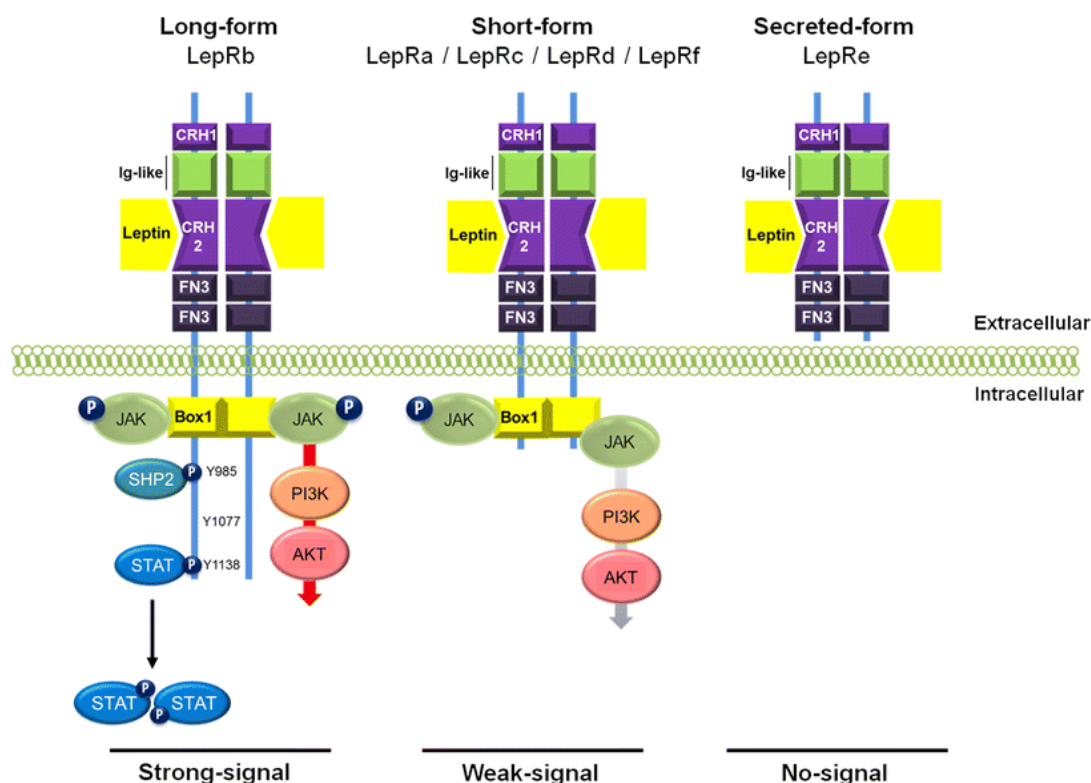


Figura 18. Representación esquemática de las isoformas del receptor de leptina descritas en ratón. (Extraído de Kwon et al., 2016)

La leptina pertenece a la familia de citoquinas de cadena larga helicoidal (Houseknecht and Portocarrero, 1998) y ejerce sus efectos a través del receptor LEP. Este receptor es de tipo tirosina quinasa, está constituido por un único dominio transmembrana y pertenece a la clase I de receptores de citoquinas. Actualmente se han descrito seis isoformas del receptor LEP generadas por *splicing* alternativo del transcrito primario del mismo gen (LEPa-f), todas ellas con el dominio extracelular necesario para la unión de ligando (Bates and Myers, 2004; Tartaglia et al., 1995) (Figura 18). Estas isoformas se organizan en tres grupos: la isoforma secretada (LEPe), la más pequeña, que únicamente expresa el dominio extracelular, de manera que puede unir leptina circulante y se relaciona con funciones de transporte (Maamra et al., 2001); las isoformas cortas (LEPa, c, d y f) y la isoforma larga (LEPb). Las isoformas larga y cortas unen leptina con la misma afinidad pero se diferencian en su dominio intracelular: de 304 residuos y múltiples sitios de unión para JAK (*Janus-activated kinase*) y STAT (*signal transducer and activators of transcription*) en LEPb, y de tan solo 34 residuos y un único dominio de unión a JAK en las isoformas cortas (Frühbeck, 2006).

Mientras las isoformas cortas LEPa-c han sido descritas en diversas especies entre ellas en humanos, la isoforma LEPd se ha encontrado solo en ratón y la isoforma LEPf se expresa solo en ratas. El transcrito de la isoforma LEPe no se ha encontrado en humanos pero si una forma del receptor soluble (Maamra et al., 2001).

Recientemente se ha creado el fenotipo del ratón KO para la isoforma corta LEPa (Dam and Jockers, 2013; Li et al., 2013). Este ratón se caracteriza por presentar, en estado de ayuno, niveles de glucosa en sangre más bajos que el WT y una mayor tolerancia a la glucosa, con un peso e ingesta normales en condiciones de dieta normal. En cambio, ante una dieta altamente calórica, estos ratones desarrollan obesidad leve, resistencia a leptina moderada y una disminución de leptina en líquido cefalorraquídeo. Estos resultados sugieren que LEPa podría mediar alguno de los efectos de la leptina aunque su papel en la regulación del metabolismo parece limitado comparado con el de la isoforma larga LEPb. LEPb es, pues, la única isoforma que tiene la capacidad completa de transmitir la señal al interior celular e iniciar así las necesarias respuestas intracelulares (Yang and Barouch, 2007).

El receptor de leptina en el SNC se localiza principalmente en el hipotálamo basomedial (Elmqvist et al., 1998; Schwartz et al., 2000); de hecho, las dos poblaciones neuronales principales del ARC son lugares clave de su expresión. Cuando la leptina se une a su receptor da inicio a la señalización intracelular a través de la fosforilación secuencial de las proteínas JAK y STAT, además de activar las vías de señalización del *insulin receptor substrate* (IRS) y la vía de las MAPK. La fosforilación del factor de transcripción STAT induce su dimerización y translocación al interior del núcleo celular, donde se une al DNA y modula la transcripción de genes relacionados con la ingesta y la homeostasis energética (Akira, 1999). La leptina induce la fosforilación de STAT1, STAT3, STAT5 y STAT6 aunque diversos estudios muestran principalmente a STAT3 como mediador de los efectos anoréxicos inducidos por la hormona (Bates et al., 2003; Vaisse et al., 1996). De hecho, STAT3 fosforilado facilita la regulación transcripcional de neuropéptidos clave en la regulación del apetito, como POMC, AgRP y NPY. La leptina incrementa la actividad transcripcional de POMC mientras una forma dominante negativa para STAT3 inhibe dicha actividad, indicando que el gen que codifica para POMC es una diana principal de la señalización LEPb-STAT3 (Münzberg et al., 2003).

En neuronas anorexigénicas y que expresan LEPb, la leptina estimula la síntesis de POMC, un precursor peptídico que es procesado por acción de convertasas dando lugar a la hormona estimuladora de melanocitos (MSH). Esta hormona es capaz, a su vez, de activar *downstream* a los receptores de melanocortina tipo 3 (MC₃) y 4 (MC₄), con un efecto depresor del apetito. Además, la leptina regula negativamente la transcripción del gen que codifica para el neuropéptido orexigénico NPY en el ARC, causando inhibición de AgRP que impide la señalización de MC₃ y MC₄ (Cowley et al., 2001; Schwartz et al., 2000).

El papel fisiológico principal de la leptina es comunicar al SNC el estado de los almacenes de energía, restringiendo la ingesta y promoviendo el consumo energético. Si bien la ausencia de leptina induce a un aumento del apetito y la ingesta que tiene como consecuencia final la obesidad mórbida, la gran mayoría de la población obesa presenta niveles elevados de leptina, asociándose el fallo a un estado de resistencia a la hormona (Frederich et al., 1995). Evidencias recientes sugieren que la resistencia a la leptina en el SNC podría ser selectiva, viéndose alterados sus efectos centrales en procesos metabólicos pero no sus efectos periféricos (Könner and Brüning, 2012). En esta línea, las alteraciones en la ingesta en respuesta a la administración de leptina reflejarían el desarrollo de

resistencia específicamente en los núcleos hipotalámicos (Münzberg et al., 2003), mientras no se verían afectadas las funciones periféricas. En paralelo a la hipótesis del desarrollo de una resistencia central, Wang y colaboradores propusieron el desarrollo de una resistencia local a nivel de tejido adiposo, que podría explicar en parte porque las elevadas concentraciones de leptina circulante observadas en animales obesos tienen poco efecto en la masa total de tejido adiposo blanco (Wang et al., 2000). A nivel de señalización, la resistencia a leptina se asocia con un rápido aumento de la expresión del *supresor of cytokine signaling* (SOCS) tipo 1 y 3, que inhibe la activación de JAK/STAT (Bjørbaek et al., 1998), junto a la supresión de la expresión del receptor LEPb (Wang et al., 2005b). A nivel fisiológico, la resistencia parece depender de factores más complejos, más allá de cambios en la respuesta de los receptores en áreas específicas o de una modificación en el transporte de leptina hacia el cerebro.

1.5. Comportamientos relacionados con recompensas a drogas de abuso

La drogadicción es una enfermedad cerebral crónica y recurrente definida como el consumo y la búsqueda compulsiva de drogas, la pérdida de control en el límite de la ingesta y la aparición de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad e irritabilidad) cuando se impide el acceso a la droga, generándose dependencia (Koob and Le Moal, 2008). Además, este desorden crónico se caracteriza por una alta tasa de recaída, es decir, la reincidencia en el consumo de drogas incluso tras un largo periodo de abstinencia. Este proceso de recaída se presenta cuando los individuos se enfrentan a estímulos sociales, ambientales o fisiológicos que se asocian al consumo de la droga (Volkow and Li, 2004). La eliminación de la importancia cognitiva de estímulos asociados al consumo de la droga parece una estrategia efectiva para combatir la adicción (Aguilar et al., 2009).

La primera referencia a una posible implicación de las orexinas en los efectos de las drogas de abuso apareció en el año 2003, y mostró que las neuronas orexinérgicas responden a la administración crónica de morfina y a su retirada abrupta provocada por antagonistas opiáceos (Georgescu et al., 2003). Estudios posteriores examinaron el posible papel de estos neuropéptidos en el proceso de recompensa y el abuso a drogas y, actualmente, se conoce el importante papel de las orexinas en respuestas condicionadas a estímulos asociados con comida y recompensa a drogas (Aston-Jones et al., 2010; Stuber and Wise, 2016). La naturaleza exacta de los efectos de las orexinas en este contexto se desconoce debido a su compleja implicación en diferentes aspectos de la búsqueda de drogas, así como en la motivación aversiva o apetitiva, interacciones con los procesos de aprendizaje Pavloviano o instrumental y estados hedónicos inducidos por las drogas de abuso.

Estímulos asociados con el sistema de recompensa incluyendo la comida, el sexo y el abuso de drogas activan las neuronas orexinérgicas (Stuber and Wise, 2016), concretamente una subpoblación de neuronas localizadas lateralmente y diferenciada de la subpoblación implicada en el mantenimiento del estado de vigilia. La activación de las neuronas orexinérgicas se relaciona con el refuerzo inducido por las drogas de abuso aunque la respuesta varía en función del tipo de droga estudiada. Por ejemplo, en ratas, el antagonista de OX_1 , SB-334867 reduce la auto-administración de heroína en paradigmas que implican o no esfuerzo de obtención, pero tan solo reduce la auto-administración de cocaína en paradigmas que implican un esfuerzo creciente para su obtención (España et al., 2010; Smith and Aston-Jones, 2012). La variedad de efectos comunes y diferenciales observados por acción de las orexinas entre las recompensas puede ser debida, en parte, a su habilidad

de activar no solo sus neuronas diana sino también de tener efectos moduladores importantes que aumentan la neurotransmisión glutamatérgica (Baimel and Borgland, 2012). Esta propiedad ayudaría a entender la gran cantidad de evidencias acumuladas que muestran que las funciones de las orexinas dependen de la diana a la que inervan, algo común en los sistemas neuromoduladores.

Efectivamente, el papel de las orexinas se concentra en al área del SNC donde las sustancias de abuso realizan su acción. En el SNC, el neurotransmisor dopamina tiene un papel clave en el aprendizaje y la facilitación de comportamientos relacionados con recompensas (Everitt and Robbins, 2005; Wise, 2004). Se han descrito dos sistemas dopaminérgicos ascendentes que se originan en dos núcleos mesencefálicos distintos: la sustancia nigra pars compacta (SNc) y el VTA. Las neuronas dopaminérgicas del VTA inervan el estriado ventral, representado principalmente por el NAc además de otras áreas pertenecientes al llamado “sistema límbico”, implicado en el procesamiento de los estímulos emocionales y motivacionales (Figura 19). La dopamina en estas áreas que proyectan al NAc está implicada en la implantación en estímulos condicionados (relacionados con recompensas) de memorias con significancia motivacional, mientras que la dopamina en el propio NAc facilita la habilidad de recompensas condicionadas o no de dirigir comportamientos previamente establecidos (Everitt and Robbins, 2005; Wise, 2004). El NAc parece actuar, pues, como una interfase funcional entre el sistema límbico y el sistema motor y la dopamina parece facilitar la conversión de motivación en acción. Las drogas psicoestimulantes como la cocaína o la anfetamina tienen como blanco de acción principal el VTA, específicamente las neuronas dopaminérgicas que conforman el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. La dopamina en este sistema orquesta los atributos de los estímulos relacionados con recompensas, codificando el valor de la recompensa en sí, creando incentivos, realizando el aprendizaje asociativo al contexto de la recompensa y determinando la predictibilidad de ésta (Koob, 2006; Schultz, 2002; Wise, 2004). Así, el NAc es estimulado vía liberación de dopamina, condicionando al individuo al consumo repetido de drogas.

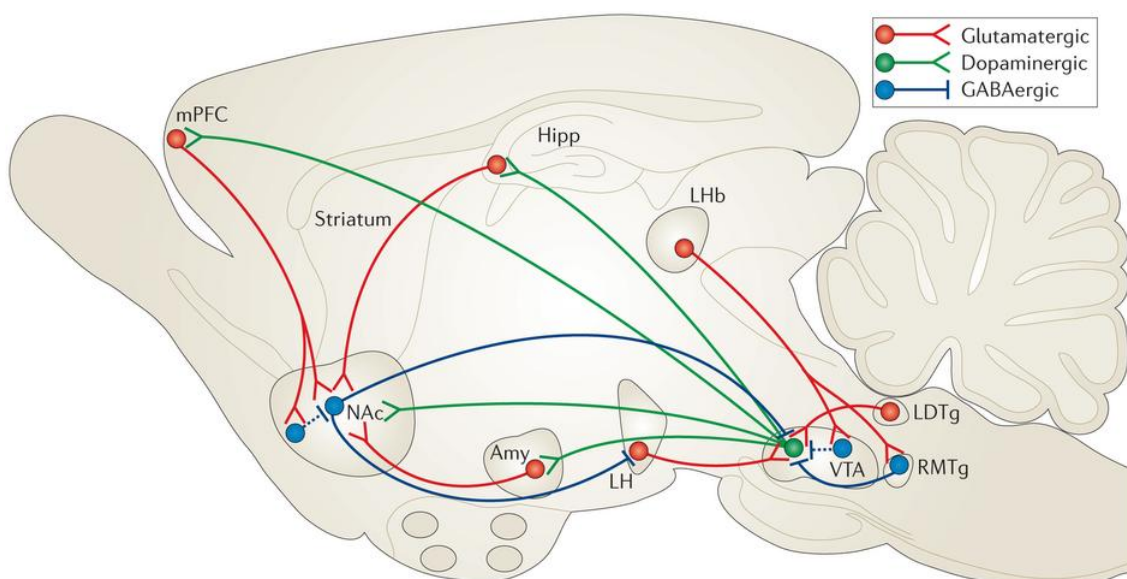


Figura 19. Esquema simplificado de las principales conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas de y hacia el VTA y el NAc en el cerebro de roedor (Extraído de Russo SJ y Nestler EJ, 2013).

Hemos comentado que la drogadicción es una enfermedad cerebral crónica que cursa con una elevada tasa de recaída. Es interesante destacar que, mediante estudios de neuroimagen en individuos adictos, se ha observado que los estímulos asociados a la recaída (estímulos condicionados, estresantes o una nueva dosis de la droga *per se*) evocan actividad neural tanto en el sistema dopaminérgico mesolímbico como mesocortical (Tzschentke, 2001). Es decir, el mismo circuito neural se activa tras el consumo y tras un estímulo que induzca al consumo. De aquí se desprende la baja efectividad de la mayoría de tratamientos en adictos aún pasado un largo periodo desde el último consumo.

Las neuronas orexinérgicas proyectan desde el LH hacia diversas áreas de la vía mesolímbica de la recompensa, incluyendo el VTA, donde el 20% de los *inputs* neuronales procedentes del LH presentan inmuno-reactividad para orexina (Balcita-Pedicino and Sesack, 2007). Además, las fibras orexinérgicas co-distribuyen con las fibras dopaminérgicas en la corteza prefrontal (PFC) medial y el *shell* medial del NAc (Fadel and Deutch, 2002) sugiriendo que orexinas y dopamina podrían interactuar en diferentes niveles de la vía de recompensa. Este circuito natural de recompensa puede ser reclutado por la exposición repetida a drogas de abuso, dando como resultado el incremento en los comportamientos de búsqueda y la aparición de una serie de adaptaciones neurales que pueden ser marcadores del proceso de dependencia.

El papel de las orexinas en la adicción a psicoestimulantes ha sido estudiado en diferentes ocasiones, así como la asociación de los comportamientos relacionados con recompensas con la activación del receptor OX_1 . De hecho, la interferencia en la neurotransmisión vía receptor OX_1 bloquea la habilidad de estímulos contextuales o discretos de provocar la recaída a los comportamientos de búsqueda de drogas o comida. En general, las orexinas incrementan la motivación por estímulos condicionados y realzan la motivación frente a la búsqueda de estimulantes, pero sin afectar a las propiedades reforzadoras de las propias drogas.

1.5.1. Adicción a psicoestimulantes

Los psicoestimulantes o estimulantes del SNC son agentes que incrementan la actividad física, el estado de alerta y la atención. Dentro de este grupo se encuentran, además de la cocaína y las metilxantinas, las anfetaminas, un grupo de drogas psicoactivas sintéticas que incluyen la anfetamina, la dextroanfetamina y la metanfetamina. La anfetamina es un derivado de la efedrina, componente natural de la planta *Ephedra sínica* que se utilizaba en la medicina china en el tratamiento del asma e infecciones respiratorias, y fue sintetizada por primera vez en 1887 por el químico rumano Lazăr Edeleanu, sin que sus efectos psicoactivos fueran detectados. No fue hasta la década de 1930 que se descubrieron sus propiedades psicoestimulantes y empezó a prescribirse como inhalador para la congestión nasal (Benzedrina©) y a recomendar su uso en narcolepsia, depresión, obesidad, hiperactividad en niños y como antiemético durante el embarazo. Su uso creció rápidamente, alcanzando su máximo en 1967 con 31 millones de prescripciones solo en Estados Unidos, debido sobre todo al bajo coste y rapidez de síntesis, a sus efectos a largo plazo y a la noción sobre el inexistente riesgo de adicción. Su abuso fue máximo en esta década, descubriéndose que la inyección intravenosa de anfetaminas y particularmente metanfetamina, estructuralmente similar pero con efectos más potentes a nivel de SNC, producía efectos eufóricos superiores y de inicio más temprano que la administración oral.

La anfetamina comprende dos estereoisómeros distintos: dextroanfetamina pura y levoanfetamina pura, siendo la dextroanfetamina pura más potente que la levoanfetamina y que la mezcla. La administración de anfetamina provoca un aumento en la liberación de dopamina y noradrenalina en sus terminales sinápticos mientras bloquea su re-captación. De 3 a 5 minutos después de la inhalación de anfetamina o pasados 20 minutos tras su administración oral aumenta el estado de alerta, la concentración y la capacidad de atención, efectos que perduran durante horas. A dosis mayores, habituales cuando se consume de manera recreativa, puede causar alteraciones cardiovasculares, aumento de la frecuencia respiratoria, hipertermia, alteraciones de las funciones cognitivas, episodios psicóticos, disminución del apetito e insomnio.

La anfetamina ejerce sus efectos a nivel de refuerzo y recompensa principalmente elevando los niveles extracelulares de dopamina y prolongando la señalización de los receptores de dopamina en el estriado. Tradicionalmente, el aumento de los niveles de dopamina por acción de la anfetamina se explica mediante tres mecanismos: primero, es un substrato para el transportador de dopamina (DAT) e inhibe de manera competitiva la recaptación de dopamina; segundo, facilita la liberación de dopamina desde las vesículas en las que se almacena a nivel citoplasmático; tercero, promueve el transporte reverso de dopamina a través de DAT hacia el espacio intersináptico de manera independiente a la liberación de dopamina vesicular inducida por potenciales de acción (Fleckenstein et al., 2007). Aunque la anfetamina y sus análogos tienen, pues, al transportador DAT como diana principal implicada en sus propiedades reforzadoras y su potencial de abuso, también ejerce acciones comparables a nivel de otros transportadores, entre los cuales se encuentran el transportador de serotonina y el transportador de noradrenalina (Fleckenstein et al., 2007). Otra diana de especial relevancia son los receptores sigma (σ_1 y σ_2), receptores presentes en elevadas concentraciones en cerebro y médula espinal, para los que la metanfetamina y otros psicoestimulantes como la cocaína muestran una afinidad significativa. La metanfetamina actúa como agonista de los receptores σ , presentando una afinidad mayor para σ_1 (K_i de 2 μM) que para σ_2 (K_i de 47 μM) (Nguyen et al., 2005), y la activación de dichos receptores se relaciona con la promoción de interacciones proteína-proteína que modulan la actividad de ciertos canales iónicos y GPCRs, con la modulación de vías de señalización, particularmente a través del incremento de calcio intracelular, así como con cambios en la expresión génica (Matsumoto et al., 2014).

Morfina, cocaína y anfetamina, aún teniendo mecanismos de acción diferentes, desarrollan sus efectos en el VTA. La inyección intra-VTA de anfetamina sensibiliza animales a los que previamente se les ha administrado anfetamina o cocaína de forma periférica (Kalivas and Weber, 1988; Vezina and Stewart, 1990), mientras que los inhibidores de la sensibilización son efectivos si se inyectan directa y localmente en el VTA. Estos resultados sugieren que el VTA es la región donde se inicia la sensibilización. Neuroadaptaciones del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico parecen subyacer a la expresión de la sensibilización locomotora tras la administración sistémica repetida de anfetamina. De hecho, ante un protocolo de administración repetida de anfetamina (5 días, 1.5 mg/kg/día intraperitoneal – i.p.) seguido de un periodo de retirada (5 días) se observa un incremento de la actividad de las neuronas dopaminérgicas y una actividad locomotora aumentada tras la administración de una nueva dosis de la droga (Lodge and Grace, 2008). Teniendo en cuenta estudios anteriores, se sugiere que los citados cambios en la señalización dopaminérgica son debidos a cambios en la transmisión glutamatérgica en el VTA (Wolf, 1998).

Hemos comentado que la drogadicción cursa con una elevada probabilidad de reincidencia en el consumo incluso tras un largo periodo de abstinencia. Este efecto es debido a cambios plásticos y neuroadaptaciones principalmente asociadas a la vía mesocorticolímbica. La potenciación a largo plazo (LTP) consiste en un incremento persistente de la transmisión sináptica excitadora, demostrada en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo a finales de los años 90 (Bonci and Malenka, 1999; Overton et al., 1999). En el hipocampo y otras regiones del cerebro como la amígdala, la corteza y el cerebelo donde ocurre el fenómeno del LTP, la potencia sináptica puede ser regulada negativamente por el proceso opuesto, llamado depresión a largo plazo (LTD). Jones y colaboradores observaron un completo bloqueo del LTD en el VTA por anfetamina, primera demostración de la modulación de la plasticidad sináptica en la vía de recompensa mediada por una droga de abuso (Jones et al., 2000). La exposición a estimulantes, pues, provoca cambios plásticos en las sinapsis excitadoras de las neuronas dopaminérgicas del VTA, implicando comportamientos relacionados con la sensibilización.

Las orexinas juegan un papel importante en modelos de adicción a psicoestimulantes como la anfetamina. Estos péptidos se encuentran involucrados en el desarrollo de la sensibilización locomotora inducida por estimulantes y en algunos casos en la expresión de la sensibilización en sí, la expresión de la preferencia de lugar condicionado (CPP) y la búsqueda instrumental de estas drogas cuando está dirigida por estados motivacionales o estímulos externos como estresantes. Contrariamente, no son necesarias para el refuerzo primario o los efectos reforzadores de la droga. De manera que las orexinas promueven específicamente la búsqueda de psicoestimulantes, permaneciendo intacta la habilidad de las propias drogas de actuar sobre los circuitos de la motivación y la recompensa.

Las orexinas juegan un papel clave en la expresión del CPP (*conditioned place preference*) a psicoestimulantes. Así, la administración sistémica de SB-334867, antagonista selectivo para OX_1 , atenúa la expresión del CPP para cocaína y anfetamina en ratas (Gozzi et al., 2011; Hutcheson et al., 2011; Sartor and Aston-Jones, 2012). Su administración sistémica o intra-VTA bloquea, además, la adquisición de la sensibilización a cocaína pero no la expresión de la sensibilización en animales testados inmediatamente después del entrenamiento, es decir, sin periodo de abstinencia (Borgland et al., 2006). Por el contrario, dado un periodo de abstinencia tras el entrenamiento de sensibilización para anfetamina, la administración de SB-334867 o del antagonista para OX_1/OX_2 N-bifenil-2-il-1-[[[1-metil-1-Hbenzimidazol-2-il)sulfanil]acetil]-1-prolinamida (DORA) bloquean la expresión de la sensibilización (Quarta et al., 2010; Winrow et al., 2010). El antagonista DORA, además, bloquea la plasticidad asociada a la expresión génica en el VTA causada por la administración repetida de anfetamina (Winrow et al., 2010).

Para entender la implicación de las orexinas en los cambios ocurridos entre una administración aguda en relación a una crónica (sensibilización), diversos grupos han investigado posibles alteraciones en la activación neuronal y en los niveles de expresión proteica. Así, la administración aguda de metanfetamina o anfetamina incrementa los niveles de expresión del gen temprano *c-fos* como marcador de actividad neuronal en neuronas orexinérgicas del DMH/PFA pero no del LH (Fadel and Deutch, 2002; McPherson et al., 2007). Por el contrario, ante un protocolo de sensibilización a anfetamina, es decir, ante un protocolo de administración crónica de anfetamina, McPherson et al. (McPherson et al., 2007) mostraron un incremento de Fos en neuronas orexinérgicas tanto del DMH/PFA como del LH, mientras los niveles de los péptidos orexigénicos no se veían alterados.

1.5.2. Receptores sigma

Los receptores sigma fueron inicialmente descritos como una subclase de receptores opioides debido a las acciones psicomiméticas del benzomorfolano racémico (\pm)-SKF-10.047 (Martin et al., 1976). Un estudio posterior mostró que el prototípico *receptor sigma-opioide* no tenía afinidad por el antagonista opioide naloxona (Su, 1982); además, demostró la estereoespecificidad para el compuesto SKF-10.047 y para el derivado opiáceo pentazocina, propiedad opuesta a la observada para todos los subtipos de receptores opioides estudiados hasta el momento mediante ensayos de *binding* y tests comportamentales (Su, 1982), y sugiriendo la nueva denominación de *receptor sigma*. Bowen y colaboradores demostraron, mediante experimentos de *binding*, la existencia de dos subtipos de receptores sigma con características estereoscópicas distintas (Hellewell and Bowen, 1990), aunque hoy en día se conoce que ambos subtipos además median tanto comunes como diferentes funciones farmacológicas y celulares. La clonación del receptor sigma-1 (Hanner et al., 1996) lo confirmó definitivamente como un receptor no opioide y dio un gran impulso al estudio de sus funciones en múltiples áreas de investigación.

A diferencia del gran número de receptores transmembrana pertenecientes a las extensas superfamilias de GPCRs y canales iónicos dependientes de ligando, el receptor sigma-1 no presenta homología con ninguna otra proteína humana. Su estructura ha sido recientemente cristalizada por Schmidt y colaboradores, mostrando una arquitectura trimérica con un único dominio transmembrana en cada protómero, además de una región hidrofóbica plana en el dominio carboxi-terminal que quedaría en contacto con la superficie celular y la membrana del RE (Schmidt et al., 2016). Por su parte, la estructura del receptor sigma-2 despierta ciertas dudas entre los investigadores; Xu y colaboradores identificaron al *progesterone receptor membrane component-1* (PGRMC-1) como la entidad potencial del receptor sigma-2 (Xu et al., 2011), aunque existen ciertas discrepancias en el peso molecular que pueden ser explicadas mediante procesos post-traduccionales o un fenómeno de *splicing* alternativo.

El receptor sigma-1 se encuentra ampliamente distribuido en tejidos periféricos y en diferentes áreas del SNC (Cobos et al., 2008), principalmente en áreas implicadas en memoria, emociones y función motora y sensorial. A nivel subcelular, a pesar de no tener maquinaria de señalización propia, una vez activado por ligandos este receptor opera vía translocación e interacciones proteína-proteína (Su et al., 2010), actuando como chaperona del RE y regulador de la señalización de calcio (Su et al., 2010), así como modulador de diversos canales iónicos (Wu and Bowen, 2008) y GPCRs (Kim et al., 2010; Navarro et al., 2010b), aunque a diferencia de sus acciones fisiológicas, los detalles de su función a nivel molecular permanecen inciertos. Por su parte, el receptor sigma-2 se expresa en altas densidades en hígado y pulmones y está relacionado con tumores y tejido proliferativo (Mach et al., 2013). A nivel subcelular, mediante estudios de fluorescencia utilizando ligandos marcados, se ha detectado la expresión del receptor sigma-2 en mitocondrias, lisosomas, RE y membrana plasmática, con la notable excepción del núcleo (Zeng et al., 2007).

Históricamente no ha sido fácil determinar ligandos agonistas o antagonistas de los receptores sigma, debido en parte a que las principales aproximaciones que permiten responder a estas cuestiones se apoyan en modelos basados en GPCRs. Un aspecto interesante del receptor sigma-1 es que puede unir con afinidad de moderada a alta un

amplio abanico de compuestos de clases estructurales distintas y con aplicaciones farmacológicas y terapéuticas diferentes, desde neurolépticos como el haloperidol a antidepresivos, antitusivos, compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (ej. anantadina) o la enfermedad de Alzheimer (ej. donepezil) y drogas de abuso como la cocaína y la metanfetamina (Cobos et al., 2008). Comparado con otras drogas de abuso, la interacción entre la cocaína y el receptor sigma-1 es la más estudiada (Hayashi and Su, 2005) debido a su moderada afinidad, de modo que, igual que sucede con los transportadores de dopamina, la cocaína interacciona con los receptores sigma a concentraciones asumibles *in vivo*, sugiriendo pues que estos receptores pueden ser dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos anti-cocaína (Matsumoto et al., 2003). De manera interesante, aunque menos estudiado se ha descrito que el receptor sigma-2 también se encuentra relacionado con los efectos de la cocaína (Guo and Zhen, 2015). La búsqueda de nuevas dianas terapéuticas efectivas contra los efectos neurotóxicos de la metanfetamina así como el estudio de los mecanismos moleculares implicados en estos efectos llevó a descubrir la interacción entre la metanfetamina y el receptor sigma-1 a concentraciones fisiológicamente relevantes (Nguyen et al., 2005). De hecho, la metanfetamina se une al receptor sigma-1 con mayor afinidad que al receptor sigma-2 (K_i de 2 μM y K_i de 47 μM , respectivamente) y ambos receptores están presentes en órganos que median los efectos de la metanfetamina, como el corazón, pulmones y cerebro (Nguyen et al., 2005). La administración de oligonucleótidos *antisense* para el receptor sigma-1 así como de antagonistas de este receptor bloquean los efectos estimulantes agudos de la metanfetamina sobre la locomoción (Kaushal and Matsumoto, 2011), y la administración repetida o la auto-administración de metanfetamina regula positivamente la expresión del mRNA del receptor sigma-1 en diversas regiones cerebrales, entre ellas la *substantia nigra*, cerebelo, hipocampo y corteza frontal (Kaushal and Matsumoto, 2011). Por su parte, el antagonista del receptor sigma-2, AC927, previene los efectos neurotóxicos de la metanfetamina, incluidos los relacionados con la depleción de los niveles de DAT y dopamina en regiones estriatales (Kaushal and Matsumoto, 2011).

En conjunto, los datos disponibles sugieren como nuevas dianas terapéuticas a los receptores sigma, especialmente al subtipo sigma-1, ofreciendo la posibilidad de establecer nuevas e innovadoras aproximaciones para combatir los efectos de la cocaína y la metanfetamina, entre otras drogas de abuso.

1.5.3. Respuesta al estrés

La dopamina en el sistema mesocorticolímbico se asocia con comportamientos relacionados con estímulos ambientales, sociales y fisiológicos, particularmente con el procesamiento de estímulos estresantes (Brischoux et al., 2009; Chaudhury et al., 2013; Tye et al., 2013).

El estrés se define comúnmente como un estado de amenaza real o de percepción de amenaza a la homeostasis. Los animales mantienen la homeostasis en presencia de estímulos internos o externos aversivos (estresantes) activando una amplia y compleja variedad de respuestas fisiológicas tanto endocrinas, nerviosas como inmunitarias, a las que llamamos “respuesta al estrés” (Carrasco and Van de Kar, 2003; Chrousos and Gold, 1992). La activación de dicha respuesta inicia diversas adaptaciones fisiológicas, entre ellas un aumento del tono cardiovascular, de la frecuencia respiratoria y del metabolismo intermedio, mientras se inhiben las funciones vegetativas generales como la alimentación, la

digestión, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad (Habib et al., 2001; Sapolsky et al., 2000). Además, la respuesta al estrés también incluye cambios de comportamiento como un aumento del estado de alerta, cognición, euforia y analgesia (Charmandari et al., 2005; Chrousos and Gold, 1992).

La respuesta es compleja e implica una gran cantidad de efectos fisiológicos y generalmente activadores y protectores a corto plazo (Keay and Bandler, 2001) aunque se convierten en patogénicos si la frecuencia, la duración y/o la intensidad de los estresantes se ve incrementada (Miczek et al., 2008; Sapolsky, 1996), de manera que es necesaria la implicación de sistemas neuronales y endocrinos para regular el proceso adaptativo a este estado. En este proceso se encuentran implicadas estructuras centrales como periféricas, siendo los efectores principales el PVN hipotalámico, el lóbulo anterior de la glándula pituitaria y la glándula adrenal, conocidos colectivamente con el nombre de eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).

El regulador principal de la respuesta al estrés es la hormona liberadora de corticotropina (CRF), responsable inicial de la respuesta hormonal en el eje HPA (Gallagher et al., 2008). Es un péptido sintetizado y secretado por las neuronas hipofisiotrópicas del PVN que, en respuesta al estrés, es liberado en las venas portales hipofisarias que dan acceso a la glándula pituitaria anterior. Aquí, CRF se une a sus receptores e induce la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación sistémica, donde viaja hacia su diana principal, la glándula adrenal. En la corteza adrenal, ACTH estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides, efectores *downstream* del eje HPA que regulan toda una serie de procesos fisiológicos mediante la unión a sus receptores intracelulares distribuidos de forma ubicua (Bamberger et al., 1996). De hecho, las acciones de los glucocorticoides están mediadas por dos receptores: los receptores de glucocorticoides (GR) y los receptores de melanocorticoides (MR) expresados ampliamente por el cerebro, incluyendo áreas implicadas en emoción, memoria y comportamiento como el septum, hipocampo y PFC (Morimoto et al., 1996; Viengchareun et al., 2007).

La activación del eje HPA es un proceso altamente controlado por sistemas endocrinos y neuronales (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Tras la exposición a un estímulo estresante, elevados niveles de glucocorticoides inhiben la actividad del HPA a nivel de hipotálamo y pituitaria (Keller-Wood and Dallman, 1984); además, los efectos neuroendocrinos de CRF son modulados por proteínas de unión a CRF (CRF-BP), que se encuentran en elevados niveles tanto en la circulación sistémica como en la glándula pituitaria. CRF-BP inhibe la secreción de ACTH inducida por CRF en la pituitaria (Westphal and Seasholtz, 2006). A nivel neuronal, las neuronas del PVN se encuentran inervadas principalmente por los otros núcleos hipotalámicos, grupos de células de la *lamina terminalis*, neuronas del tronco encefálico y estructuras límbicas. Las neuronas catecolaminérgicas procedentes del NTS del tronco encefálico envían información sensorial de los nervios craneales que inervan áreas torácicas y viscerales, además de recibir proyecciones desde estructuras límbicas que regulan comportamientos en respuesta al estrés. Por otra parte, células de la *lamina terminalis* envían información al PVN sobre la composición osmótica de la sangre (Ulrich-Lai and Herman, 2009), mientras neuronas GABAérgicas de regiones hipotalámicas como el DMH y el área preóptica (POA) y neuronas del ARC integran la información de los esteroides gonadales y los centros de control de la ingesta. Por su parte, el hipocampo juega un papel importante en la terminación de la respuesta al estrés del eje HPA (Ulrich-Lai and Herman, 2009); la estimulación hipocampal disminuye la actividad neuronal en el PVN e inhibe la secreción de glucocorticoides (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Como el hipocampo, la corteza prefrontal también tiene efectos inhibidores sobre el eje HPA mientras que la

estimulación de la amígdala promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides a la circulación sistémica (Ulrich-Lai and Herman, 2009).

Además del eje HPA, la activación de neuronas noradrenérgicas del tronco encefálico y circuitos adrenomedulares simpáticos también contribuyen a la respuesta frente a estímulos estresantes. El LC contiene la mayor cantidad de neuronas noradrenérgicas en el cerebro, activadas por gran variedad de estímulos estresantes que alteran su actividad electrofisiológica e inducen la liberación de noradrenalina (Henckens et al., 2016). La estimulación del LC promueve diversas respuestas asociadas al estrés, como la liberación de ACTH, comportamientos ansiogénicos y supresión de las funciones inmunes (Henckens et al., 2016).

El mantenimiento de la homeostasis ante amenazas reales o percibidas requiere, pues, de la activación de toda una compleja batería de respuestas neuroendocrinas, nerviosas e inmunes. La regulación inapropiada de la respuesta al estrés ha sido asociada con múltiples patologías, incluyendo enfermedad autoinmune, hipertensión, desórdenes afectivos y depresión mayor.

1.5.4. CRF: péptidos y receptores

CRF es un neuropéptido de 41 aminoácidos, que fue aislado y caracterizado estructuralmente por Vale y colaboradores en 1981 (Vale et al., 1981). Desde entonces se ha descrito una creciente familia de ligandos y receptores. En mamíferos, dicha familia incluye a los neuropéptidos urocortina I (UcnI), Ucn II y Ucn III, los receptores CRF₁ y CRF₂ y una proteína de unión a CRF (CRF-BP)(Kuperman and Chen, 2008). Estos ligandos difieren tanto en su distribución como en su farmacología. CRF presenta diez veces más afinidad por CRF₁ que por CRF₂, mientras UcnI presenta afinidades parecidas por ambos receptores. Por su parte, UcnII y UcnIII son ligandos selectivos para CRF₂, aunque UcnII puede activar a CRF₁ a concentraciones altas (Kuperman and Chen, 2008).

Estudios de inmunohistoquímica y radioinmunoensayo mostraron una distribución amplia y heterogénea de CRF en el SNC (Henckens et al., 2016). Como estimulador clave de la respuesta al estrés, CRF se encuentra en el PVN hipotalámico, el núcleo central de la amígdala (cAmyg) y en regiones del romboencéfalo a nivel central, y en intestino, piel y glándulas adrenales a nivel periférico. UcnI, por su parte, se expresa de manera predominante en los cuerpos celulares del núcleo Edinger-Westfal en el cerebro y en el tracto gastrointestinal, testículos, miocitos cardíacos, timo, piel y médula a nivel periférico. Los ligandos clonados más recientemente, UcnII y UcnIII, también se encuentran tanto a nivel central como periférico (Henckens et al., 2016).

Los receptores de CRF pertenecen al subtipo B de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Son producidos a partir de distintos genes y presentan diferentes variantes de *splicing* expresadas tanto a nivel periférico como central (Figura 20). CRF₁ presenta dos isoformas, α y β , detectadas tanto en humanos como en roedores (Grammatopoulos and Chrousos, 2002; Pisarchik and Slominski, 2001). Por su parte, CRF₂ se expresa en tres subtipos funcionales, α y β (detectadas en roedores y humanos) y γ (exclusivamente en humanos)(Dautzenberg and Hauger, 2002), que difieren entre sí en la secuencia del extremo N-terminal así como en su distribución en tejidos y entre especies. Ambos receptores presentan un 70% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica.

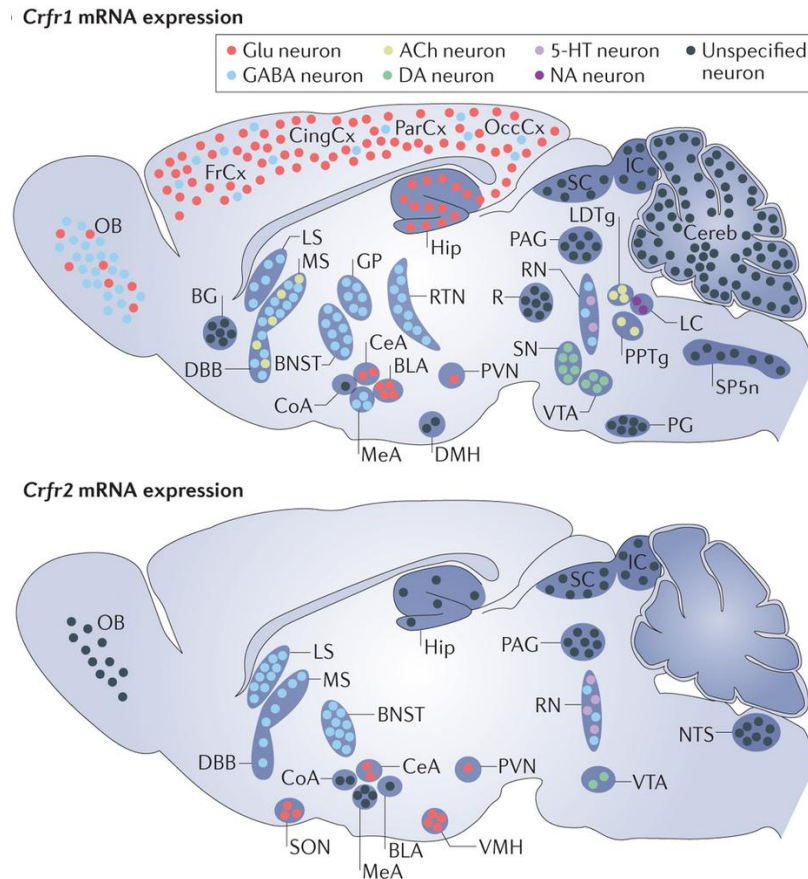


Figura 20. Representación esquemática de la distribución del mRNA del receptor CRF₁ (arriba) y del mRNA del receptor CRF₂ (abajo) en diferentes tipos neuronales en una sección sagital del cerebro de roedor (Extraído de Henckens, Deussing y Chen, 2016).

Como GPCRs, su activación se asocia con numerosas vías de señalización intracelular. Se acoplan de manera preferencial a la proteína G_s, activando la enzima AC e induciendo un aumento ligando-dependiente de cAMP. Aún así, diversas evidencias muestran una señalización promiscua tejido-dependiente de estos receptores a través de otros sistemas de segundos mensajeros (Henckens et al., 2016). El aumento de cAMP provoca la activación de PKA y su factor de transcripción asociado, *cAMP response element binding protein* (CREB) (Henckens et al., 2016). De la misma manera que el factor CREB, la activación del factor de transcripción Nur77 inducida por CRF está bien establecida; por el contrario, la activación del factor NF- κ B está regulado de manera diferencial dependiendo del tipo celular. La activación de los receptores de CRF también induce la activación de la vía de las MAPK, que inicialmente se describió dependiente de la actividad de PKA; la activación de PKA implica la fosforilación de ERK vía activación secuencial de la proteína G pequeña Rap1 y la quinasa MAPKK B-Raf, molécula clave en la activación de ERK por señales dependientes de cAMP (Kovalovsky et al., 2002). Estudios recientes en células CHO (*Chinese hamster ovary*) y células HEK (*human embryonic kidney*) transfectadas con el receptor CRF₁ muestran como la activación de ERK1/2 puede depender de PI3K y PLC, PKC o PKA dependiendo del ligando que lo active (Arzt and Holsboer, 2006), es decir, que diferentes ligandos actuando sobre un mismo receptor pueden activar distintas vías de señalización dependiendo del contexto celular en que se encuentren.

1.5.5. Efecto del estrés sobre la adicción a drogas de abuso

Una muestra de plasticidad sináptica en el VTA se desprende de la descripción del fenómeno de LTP del *input* excitador de las neuronas dopaminérgicas (Bonci and Malenka,

1999; Overton et al., 1999), potenciación similar a la inducida en ratones C57/Bl6 expuestos una sola vez a cocaína, anfetamina, nicotina, morfina o estrés (Saal et al., 2003; Ungless et al., 2001). Como se ha comentado anteriormente, CRF es el regulador principal de la respuesta al estrés, responsable inicial de la respuesta hormonal en el eje HPA (Gallagher et al., 2008).

Se ha sugerido que el estrés puede ser un potente inductor de la recaída a drogas de abuso (Sarnyai et al., 2001; Sinha, 2001) y el sistema CRF, por tanto, debe jugar un papel clave. Estudios en animales sugieren que un estrés débil por *footsbock* induce la recaída vía acciones centrales de CRF (Mantsch et al., 2016); de hecho se ha demostrado que un estímulo estresante induce la liberación de CRF en el VTA de ratas, provocando un aumento local de glutamato en este núcleo y activando las neuronas dopaminérgicas en ratas con experiencia previa a cocaína. En ratas sin experiencia previa a cocaína, el estímulo estresante causa también una liberación de CRF en el VTA pero no un aumento del glutamato ni la activación de neuronas dopaminérgicas, sugiriendo que la auto-administración de cocaína en ratas puede causar neuroadaptaciones (cambios plásticos) en las neuronas glutamatérgicas o en los terminales (Wang et al., 2005a).

A nivel de VTA, pues, CRF potencia la transmisión sináptica mediada por NMDA; la restitución de la búsqueda de cocaína inducida por estrés (*footsbock*) y la liberación de glutamato en el VTA es bloqueada por antagonistas selectivos del receptor CRF₂ pero no por antagonistas selectivos del receptor CRF₁ (Wang et al., 2005a, 2007). Estos resultados parecen difíciles de conciliar con evidencias previas, que muestran una mayor expresión del mRNA de CRF₁ en el VTA respecto a la cantidad detectada del mRNA de CRF₂ por hibridación *in situ* (Van Pett et al., 2000), además de la mayor afinidad de CRF por CRF₁ (Behan et al., 1996). Una posibilidad es que los efectos mediados por CRF₁ sean dependientes de otras regiones del cerebro como el BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*), inmuno-reactivo también para CRF y CRF₂ y en el que la inyección de un antagonista selectivo de CRF₁ es suficiente para bloquear la recaída a la búsqueda de cocaína y morfina inducida por *footsbock* (Erb and Stewart, 1999; Wang et al., 2006). El papel crítico de CRF₂ en la eficacia del estrés inducido por *footsbock*, la liberación de glutamato y la activación mesocorticolímbica dopaminérgica sugieren un papel específico en el VTA diferente a otras regiones. Otra posibilidad es la expresión de los receptores en subpoblaciones neuronales distintas en el VTA.

En este sentido, la dicotomía observada en los efectos entre CRF₁ y CRF₂ parece estar detrás de la plasticidad homosináptica y heterosináptica mediada por CRF y descrita por Gallagher y colaboradores (Gallagher et al., 2008). Estudios genéticos han asociado fuertemente a CRF₁ con la ansiogénesis, de manera que este receptor jugaría un papel estimulador de la respuesta al estrés, facilitando la transmisión glutamatérgica y actuando de soporte para el LTP (Gallagher et al., 2008; Ji and Neugebauer, 2007; Risbrough et al., 2004). Por otra parte, el receptor CRF₂ ha sido asociado preferentemente con la ansiolisis, y estaría reduciendo la sensibilidad al estrés y promoviendo la recuperación de situaciones estresantes, disminuyendo las respuestas glutamatérgicas (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000; Kishimoto et al., 2000). Fu y Neugebauer (Fu and Neugebauer, 2008) describieron recientemente la depresión heterosináptica de la liberación de glutamato en la amígdala mediada por CRF₂, a través del incremento de la transmisión GABAérgica que a su vez activa los receptores GABA_B pre-sinápticos. Estudios anteriores ya habían revelado que los receptores GABA_B regulan también la transmisión glutamatérgica en el VTA (Manzoni and Williams, 1999), de manera que se sugiere la posibilidad que los receptores CRF₂ regulen indirectamente la liberación de glutamato vía cambios en la transmisión GABAérgica

(Figura 21). Tradicionalmente se ha obviado la importancia de las sinapsis inhibitoras y el estudio de la plasticidad mediada por CRF en el VTA se ha centrado en las sinapsis excitadoras, requeridas para el aprendizaje de la auto-administración de las recompensas naturales (Chen et al., 2008). Recientemente, Williams y colaboradores (Williams et al., 2014) demostraron que la activación de CRF_1 incrementa la transmisión glutamatérgica en el VTA mientras CRF_2 incrementa la liberación de GABA y atenúa la liberación de glutamato mediante la activación de los receptores pre-sinápticos $GABA_B$, comportamiento similar al descrito en la amígdala. Sin embargo, tras la recaída en un protocolo de auto-administración de cocaína, CRF_2 cambia su función e incrementa las corrientes post-sinápticas excitadoras (EPSCs), reduciendo la inhibición dependiente de GABA.

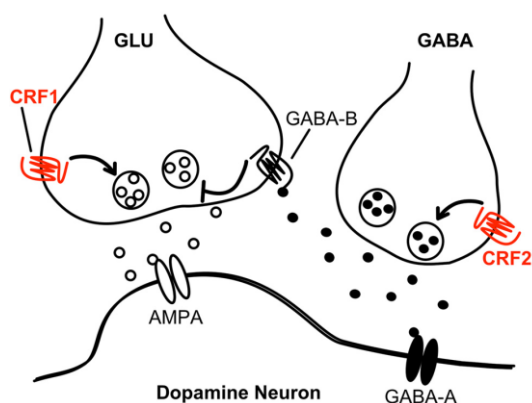


Figura 21. Representación esquemática de la regulación de la liberación de glutamato en el VTA vía CRF. (Extraído de Williams et al., 2014)

Como se ha comentado anteriormente, las orexinas están implicadas en el procesamiento de las recompensas y en los trastornos por consumo de sustancias de abuso, dependientes de la densa inervación orexinérgica de las células dopaminérgicas del VTA (Borgland et al., 2006; Mahler et al., 2014; Sakurai, 2014). Teniendo en cuenta el comentado aumento del glutamato mediado por CRF en el VTA, Geisler et al. (Geisler et al., 2007) mostraron que alrededor del 20 % del glutamato en esta región proviene de la corteza y el otro 80% proviene de distintos núcleos sub-corticales, de los cuáles el LHA es la más prominente. El LHA es la fuente principal de neuronas orexinérgicas, responsables del evento motivante

excitador en el hipotálamo lateral (LH) frente a la alimentación (Sakurai et al., 1998). Estas neuronas en el LHA y áreas cercanas proyectan sus axones a varias regiones, entre ellas al PVN, al LC y al núcleo dorsal del rafe, estructuras implicadas en las respuestas físicas y fisiológicas inducidas por estrés (Date et al., 1999; Nambu et al., 1999; Peyron et al., 1998). El sistema orexinérgico conduce a la recaída al consumo de cocaína debido a la activación de vías de estrés, que incluyen la participación de CRF. En general, el estrés activa el eje HPA y las orexinas están involucradas en la regulación de este eje. Ida y colaboradores reportaron un aumento de los niveles de mRNA de prepro-orexina en ratas de dos meses sometidas a estrés por inmovilización (Ida et al., 2000), mientras que Zhu y colaboradores reportaron un aumento de la proteína Fos en neuronas orexinérgicas tras un estímulo nocivo (Zhu et al., 2002). Stricker-Krongrad y Beck, por su parte, mediante hibridación *in situ* en ratas Sprague-Dawley adrenalectomizadas, mostraron una disminución del 50% del mRNA de prepro-orexina en el LH, y que el tratamiento periférico con glucocorticoides (dexametasona) recuperaba los niveles normales de expresión (Stricker-Krongrad and Beck, 2002). Por tanto, los niveles de expresión de las orexinas en el LH están modulados por el *status* glucocorticoide. Por otra parte, y como se comentó anteriormente, la inyección icv de orexinas estimula el eje HPA, afectando los estados de vigilancia y la respuesta al estrés (Kuru et al., 2000). La relación entre el sistema CRF y el sistema orexinérgico, pues, es recíproca y se relaciona con el mantenimiento de los estados de vigilancia durante los acontecimientos estresantes (Winsky-Sommerer et al., 2004).

Una muestra más de la relación entre el sistema orexinérgico y la recaída al consumo de drogas inducida por estrés la encontramos en otro modelo animal de adicción y recaída. Un paradigma usado para medir los efectos aversivos o apetitivos de las drogas de abuso consiste en examinar los efectos de dichas drogas a través del comportamiento derivado de la auto-estimulación eléctrica intracraneal (ICSS). En este modelo, los animales de experimentación llevan a cabo comportamientos instrumentales con el objetivo de recibir un estímulo eléctrico en una región concreta del cerebro, siempre que dicho estímulo supere una determinada intensidad o umbral. Cambios en el umbral son interpretados como el reflejo de variaciones en el estado hedónico de los animales; mientras que drogas adictivas u otras manipulaciones relacionadas con recompensas disminuyen el umbral de estimulación, sugiriendo estados hedónicos positivos, estrés u otras manipulaciones aversivas como la abstinencia aumentan el nivel umbral, implicando estados hedónicos negativos (Koob and Le Moal, 2008; Markou et al., 1993; Wee and Koob, 2010). El receptor OX_1 se relaciona con la recaída al consumo de drogas inducida por estrés. Boutrel et al. (Boutrel et al., 2005) mostraron como la administración sistémica de SB-334867, antagonista selectivo para OX_1 , bloquea la recaída inducida por estrés (*footsbock*), mientras que la administración icv de orexina incrementa el umbral de ICSS, sugiriendo que la orexina puede modular las vías de estrés o los comportamientos afectivos negativos. Además, la infusión icv de orexina restablece el comportamiento de búsqueda de cocaína previamente extinguido, mientras que la administración sistémica de antagonistas no selectivos para CRF bloquea este efecto (Boutrel et al., 2005).

Hemos comentado la relación entre las orexinas y la respuesta al estrés, principalmente mediada por CRF, así como la importancia del estrés en la recaída al consumo de drogas de abuso. Además, muchos estudios que sugieren una estrecha relación entre ambos sistemas con un papel modulador en el proceso de recaída al consumo de psicoestimulantes. Como consecuencia, el estudio del papel del receptor OX_1 y su relación con el receptor CRF_2 , ambos presentes en el VTA, se plantea como un objetivo de especial relevancia.

1.6. Sistema cannabinoide



Figura 22. Imagen de una hoja de *Cannabis sativa* (superior) y de *Cannabis indica* (inferior).

El uso del cannabis, sea para fines medicinales, textiles, de inspiración religiosa o recreativa se remonta a muchos siglos atrás (Russo et al., 2008; Skoglund et al., 2013). De hecho, la primera referencia escrita sobre su uso contra el dolor y la inflamación la encontramos en China, en el libro *El Herbario*, atribuido al padre de la farmacología china, el emperador rojo Shen Nung (aprox. 2695 AC). Se tienen referencias también del antiguo Egipto, la India, Grecia, Roma y de la medicina medieval Islámica, aunque la introducción de su uso estrictamente terapéutico en la medicina occidental no está documentado hasta 1839 (O'Shaughnessy, 1839). A partir de aquí, su consumo recreativo y el consecuente abuso crecieron de manera imparable, despertando un interés cada vez mayor para entender las bases moleculares que subyacían a sus efectos psicotrópicos. Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 cuando Raphael Mechoulam y Yechiel Gaoni identificaron, aislaron y sintetizaron de manera inequívoca el principal componente psicotrópico de la planta *Cannabis sativa*: el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni Y., Mechoulam R., 1964). Inicialmente se

creyó que el Δ^9 -THC era responsable de los efectos psicoactivos de la planta ejerciendo su acción de manera no específica; por una parte porque sus dos formas enantioméricas presentan actividad, hecho que se creía incompatible con la acción sobre substratos biológicos como los receptores, las enzimas o los canales iónicos y, por otra parte, debido a su naturaleza hidrofóbica que le permitiría alterar los componentes fosfolipídicos de las membranas biológicas.

No fue hasta tres décadas tras la identificación del Δ^9 -THC que el grupo de Allyn Howlett publicó la primera evidencia sobre la existencia de un receptor cannabinoide específico en el cerebro (Devane et al., 1988). En 1990, Matsuda y colaboradores (Matsuda et al., 1990) descubrieron que el GPCR huérfano SKR6, derivado del cDNA de una librería obtenida a partir de corteza cerebral de rata era capaz de mediar los efectos del Δ^9 -THC. Así, se estableció la identidad del primer receptor específico para cannabinoides presente en tejidos de mamíferos, al que llamaron CB_1 . Tan solo tres años más tarde, Munro y colaboradores (Munro et al., 1993) identificaron el segundo receptor cannabinoide, CB_2 , a partir del receptor huérfano CX5 expresado en la línea celular de leucocitos inmaduros, promielocitos humanos, HL60.

Tras el clonaje del receptor CB_1 y la seguridad que un receptor presente en mamíferos no respondería únicamente a componentes vegetales, se hipotetizó la existencia de ligandos endógenos producidos por el cuerpo humano que pudieran unirse específicamente a dicho receptor. Solo dos años más tarde, la hipótesis fue rápidamente confirmada con la identificación y aislamiento de los primeros endocannabinoides, el N-araquidonoiletanolamina o anandamida y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), ambos sintetizados según demanda (véase apartado 1.6.1.3. Ligandos cannabinoides). A raíz de estos descubrimientos, el flujo de investigación creció notablemente, revelando la existencia de un completo sistema de señalización, el sistema endocannabinoide, que rápidamente pasó a ser un campo importante de la bioquímica.

Es interesante resaltar el origen y el significado actual de la palabra “cannabinoide”. que surgió originariamente para designar una serie de compuestos que se encuentran de manera natural en la planta *Cannabis sativa* (y en la variedad *Cannabis indica*, con menor proporción de Δ^9 -THC) (Figura 22), y que tienen en común un hidrocarburo aromático de 21 carbonos (Elsohly and Slade, 2005). Sin embargo, en los últimos años se han descrito gran cantidad de productos naturales derivados de la planta *Cannabis sativa* que no presentan la misma estructura aunque sí pueden unir e interaccionar funcionalmente con los receptores cannabinoides; este hecho ha llevado a acuñar el término “fitocannabinoide”. Bajo esta denominación se agrupan pues, todos los productos naturales derivados de dicha planta, capaces de interaccionar directamente con los receptores cannabinoides y con otras proteínas del sistema como enzimas hidrolíticas que controlan los niveles de ligandos endógenos, así como compuestos que comparten características químicas con aquéllos. En cambio, “cannabinoide” se considera actualmente un término amplio usado para denominar tanto a los compuestos naturales como a los sintéticos. Por su parte, entendemos por sistema endocannabinoide todos los componentes de una red compleja de señalización mediante lípidos, con funciones neuromoduladoras e inmunomoduladoras a nivel central y periférico, que comprende al menos dos receptores de tipo GPCR (CB_1 y CB_2), los ligandos endógenos derivados del ácido araquidónico o endocannabinoides, siendo la anandamida y el 2-AG los mejor caracterizados, y las enzimas que los sintetizan y degradan así como posibles transportadores, que regulan los niveles de endocannabinoides y la acción de estos sobre sus receptores (Di Marzo, 2008; Pertwee, 2005a).

Actualmente el cannabis o marihuana permanece en el grupo I de drogas de abuso según la FDA (U.S. Food and Drug Administration) que rige la política federal de drogas en Estados Unidos, por lo que tanto su estudio como su uso medicinal está regulado. Los aspectos de seguridad en relación al cannabis incluyen el incremento en el riesgo de desarrollar esquizofrenia por consumo durante la adolescencia, alteraciones cognitivas y de memoria, posibilidad de ingestiones pediátricas accidentales y la ausencia de formulaciones de cannabis medicinal seguras. Aún así, en países como Canadá, Holanda y Chile el consumo personal con fines recreativos está despenalizado y la prescripción de marihuana con fines medicinales es legal. Y existen diversos medicamentos basados en cannabis actualmente disponibles en muchos países, entre ellos Estados Unidos, Canadá y gran parte de Europa, como el dronabinol y el nabilon, indicados para el tratamiento de náuseas y vómitos asociados a quimioterapia y a anorexia asociada con la pérdida de peso en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y el nabiximol (combinación equimolar de Δ^9 -THC y CBD), comercializado como Sativex® e indicado en el tratamiento del dolor neuropático y la espasticidad en pacientes con esclerosis múltiple (Borgelt et al., 2013).

1.6.1. Receptores cannabinoides y ligandos

La identificación de los receptores cannabinoides fue el fruto de la investigación realizada para entender los efectos psicoactivos del Δ^9 -THC, principal componente psicotrópico del cannabis. Devane y colaboradores (Devane et al., 1988) fueron los primeros en evidenciar que los cannabinoides inhiben la enzima AC a través de la activación de un GPCR, y Matsuda y colaboradores (Matsuda et al., 1990) clonaron y caracterizaron molecularmente el primer receptor específico para Δ^9 -THC. Solo 3 años más tarde, Sean Munro y colaboradores (Munro et al., 1993) clonaron el segundo de los receptores, renombrando al primero como CB₁ y a éste como CB₂. Ambos receptores, CB₁ y CB₂, pertenecen a la clase A (*rhodopsin-like*) de la superfamilia de GPCRs y son activados por Δ^9 -THC y otros compuestos farmacológicamente activos, aunque no psicotrópicos, del cannabis como el cannabidiol (CBD). Los ligandos cannabinoides se dividen entre ligandos directos, que son aquellos compuestos que se unen a los receptores cannabinoides con afinidades elevadas, del rango de nM, y que ejercen efectos funcionales discretos (por ejemplo agonismo, antagonismo o agonismo inverso), y los ligandos indirectos, que tienen como dianas principales las proteínas que forman parte del sistema endocannabinoide, regulando los niveles tisulares de endocannabinoides y que actúan como ligandos alostéricos del receptor CB₁. Sin embargo, a raíz del descubrimiento del receptor CB₂ y teniendo en cuenta que los receptores CB₁ y CB₂ no son capaces de explicar todas las funciones atribuidas a los cannabinoides, además, la gran disyuntiva que rodea al elevado número de ligandos putativos existentes, diversas investigaciones han sugerido la existencia de otros receptores cannabinoides, el primero los cuales fue el receptor huérfano GPR55, al que se definió inicialmente como una diana de acción del Δ^9 -THC, pero que aún hoy sigue incitando cierta discusión (Johns et al., 2007; Oka et al., 2007; Pertwee, 2010). En todo caso, diversos estudios lo han mostrado como un buen candidato para poder explicar los efectos de ciertos cannabinoides que parecen ser independientes de CB₁ y de CB₂ (Moriconi et al., 2010). A parte del receptor GPR55, está ampliamente aceptado que algunos endocannabinoides, como el Δ^9 -THC y otros compuestos sintéticos que actúan como agonistas y antagonistas para CB₁ y CB₂, pueden interactuar con canales iónicos (Oz, 2006) y otros GPCRs como el receptor de serotonina 5-HT₃ (Xiong et al., 2008), receptores

nicotínicos de acetilcolina (Butt et al., 2008), ionotrópicos de glutamato (NMDA) (Hampson et al., 1998) y receptores de glicina (Yang et al., 2008) (Véase apartado 1.6.1.2. Receptores GPR55 y TRPV1).

Es necesario tener en cuenta que la densidad de receptores cannabinoideos en el cerebro es comparable a los niveles de receptores de glutamato, GABA y dopamina en el estriado (Herkenham et al., 1990), de manera que es predecible decir que estos receptores son componentes ubicuos de las sinapsis químicas como lo son los neurotransmisores convencionales. Además, el patrón de distribución de los receptores es bastante similar entre especies, indicando una conservación en su función fisiológica.

1.6.1.1. Receptores CB₁ y CB₂

El receptor CB₁ es una proteína de 472 aminoácidos codificada por el gen CNR1, localizado en el cromosoma 6q15 en humanos (Figura 23). Fue clonado a partir de tejidos de rata, ratón y humano, presentando entre un 97 y un 99% de identidad de secuencia aminoacídica entre especies. Su localización se ha determinado mediante autoradiografía cuantitativa (Herkenham et al., 1991), hibridación *in situ* (Marsicano and Lutz, 1999) e inmunohistoquímica (Mackie, 2005), y ha revelado que es el GPCR más abundante a nivel de SNC en mamíferos, particularmente en ciertas regiones del cerebro como los ganglios basales, el cerebelo y el hipocampo (Pertwee, 1997). Mientras que son relativamente pocas las neuronas que presentan niveles del mRNA de CB₁ muy elevados, gran cantidad de neuronas presentan niveles moderados. Se localiza preferentemente en axones y terminales, donde de manera preferente inhiben la liberación de diferentes neurotransmisores excitadores e inhibidores, jugando un importante papel como neuromodulador. A nivel central parece afectar procesos como la cognición, la memoria y el control de la función motora, además de estar implicado en el control de la ingesta, la analgesia y la emesis. También está presente en terminales de neuronas periféricas localizadas en distintos órganos y sistemas, como los testículos (Gérard et al., 1991), el colon (Wright et al., 2005) y el tejido adiposo (Roche et al., 2006), entre otros.

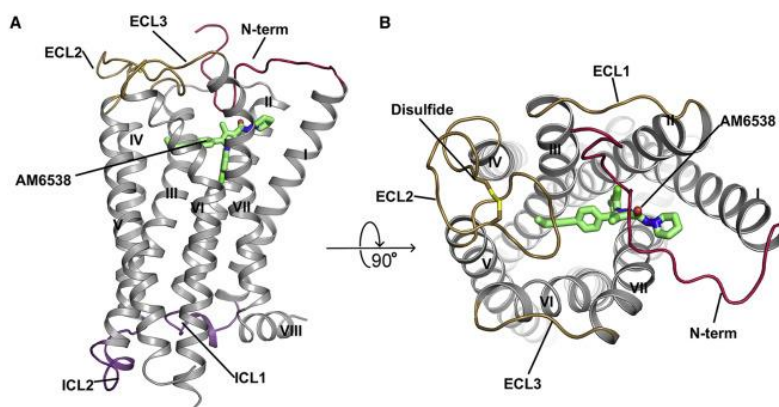


Figura 23. Representación de la estructura cristalina del receptor CB₁ unido al antagonista AM6538. (A) Vista paralela al plano de la membrana (B) Vista perpendicular al plano de la membrana, desde el lado extracelular. (Extraído de Hua et al., 2016)

El receptor CB₁ presenta diversos sitios de regulación alostérica que pueden ser diana de diferentes ligandos, favoreciendo o inhibiendo la activación del receptor por parte de ligandos directos (Horswill et al., 2007; Navarro et al., 2009).

Por otra parte, el gen CNR2, situado en el cromosoma 1p36.11 en humanos, codifica para el receptor CB₂, constituido por 360 aminoácidos. Presenta un 68% de identidad con el receptor CB₁ a nivel de regiones transmembrana, implicadas presumiblemente en la interacción ligando-receptor, pero se reduce al 44% si comparamos toda la proteína, debido a las múltiples variaciones en los bucles extra- e intracelulares (Munro et al., 1993). El análisis de su secuencia muestra un 93% de identidad aminoacídica entre rata y ratón y un 81% entre la secuencia de rata y humano (Reggio, 2010). El receptor CB₂ se expresa principalmente a nivel de sistema inmune, incluyendo macrófagos del bazo, linfocitos-B o células mononucleares de sangre periférica entre otras (Galiègue et al., 1995; Howlett et al., 2002). La especificidad de localización en células inmunes sugieren un papel inmunomodulador para este receptor; de hecho, diversos estudios muestran un papel clave en la modulación de la migración leucocitaria (Franklin and Stella, 2003; Kishimoto et al., 2003) además de regular la respuesta antígeno-anticuerpo (McCoy et al., 1999). Más recientemente se ha descrito su expresión en SNC, tanto en neuronas como especialmente en microglia, en condiciones fisiológicas (Maresz et al., 2005; Van Sickle et al., 2005) y patológicas (Ashton and Glass, 2007; Onaivi et al., 2008).

Tanto CB₁ como CB₂ son GPCRs acoplados preferentemente a proteína G_{i/o}, provocando la inhibición de la enzima AC y la disminución de cAMP, y activando la vía de señalización de las MAPK, con la consecuente expresión de genes inmediatos. Además, el receptor CB₁ también es capaz de mediar la activación de canales de potasio de rectificación interna y dependientes de voltaje de tipo A e inhibir canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N, P y Q (Guo and Ikeda, 2004). Hay que puntualizar, sin embargo, que diversos estudios también han establecido la posibilidad de que el receptor CB₁ se acople a la proteína G_s (Jarrahian et al., 2004).

Mientras que CB₁ se considera principalmente un receptor neuronal, CB₂ es el receptor cannabinoide predominante en el sistema inmune. De esta especificidad en la distribución así como de la abundante expresión del receptor CB₁ se desprende un enorme potencial terapéutico, ejemplo paradigmático del cual son los efectos beneficiosos del Δ⁹-THC en pacientes de esclerosis múltiple, mediados por CB₁ neuronales y por CB₂ en células T auto-reactivas (Maresz et al., 2007). No obstante, diversos estudios han establecido efectos periféricos de CB₁ en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (Kunos et al., 2009) así como efectos centrales mediados por CB₂, principalmente en la regulación de la emesis y en los comportamientos relacionados con el sistema de recompensa a cocaína (Van Sickle et al., 2005; Xi et al., 2011).

1.6.1.2. Receptores GPR55 y TRPV1

Actualmente sabemos que los endocannabinoides, además de activar los receptores CB₁ y CB₂, también pueden interactuar con otros GPCR como los receptores huérfanos GPR18 (Kohn et al., 2006) y GPR55 (Ryberg et al., 2007), con canales iónicos como el receptor vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Ross, 2003), canales de potasio, receptores nicotínicos y receptores de serotonina 5-HT₃, entre otros. Las interacciones con GPR55 y TRPV1 son las más estudiadas.

El gen localizado en el cromosoma 2q37.1 en humanos codifica para el receptor GPR55, de 319 aminoácidos (Sawzdargo et al., 1999). Es considerado un receptor huérfano aunque desde hace una década diversos estudios lo han descrito como un receptor funcional

intrínseco para lisofosfatidilinositol (LPI) (Oka et al., 2007), un lisofosfolípido ácido producto de degradación del fosfatidilinositol como el endocannabinoide 2-AG. Se ha reportado su expresión en diversos tejidos de mamíferos, como en tejido adiposo mamario, testículos, bazo y diversas regiones del cerebro (Sawzdargo et al., 1999). Debido a que su actividad puede ser modulada por algunos fito y endocannabinoides (el CBD, con baja afinidad para CB₁, actúa como antagonista de GPR55 (Ross, 2009; Ryberg et al., 2007)), diversos grupos han propuesto a GPR55 como el futuro receptor cannabinoide CB₃; (Johns et al., 2007; Ryberg et al., 2007). No obstante, GPR55 no presenta el clásico bolsillo de unión a cannabinoides presente en CB₁ y CB₂ (Petitet et al., 2006) además de presentar una baja identidad de secuencia con ellos: solo un 13,5% con CB₁ y un 14,4% con CB₂.

GPR55 pertenece a la clase A (*rhodopsin-like*) de la superfamilia de GPCRs. En células en cultivo, el receptor GPR55 se acopla a G_{12/13} y a G_q y su activación evoca oscilaciones de Ca²⁺ intracelular a través de un mecanismo de movilización de los almacenes de Ca²⁺ mediado por Rho-A y sensible a IP₃ (Henstridge et al., 2009; Lauckner et al., 2008; Waldeck-Weiermair et al., 2008), aunque Sylantiev y colaboradores (Sylantiev et al., 2013) demostraron que también puede inducir la movilización de almacenes de Ca²⁺ de manera independiente de IP₃.

Se ha publicado la implicación de GPR55 en el control del dolor, específicamente en hiperalgesia mecánica inducida por dolor inflamatorio y neuropático (Staton et al., 2008) y en el control de la formación ósea (Whyte et al., 2009). Además, numerosas evidencias muestran a GPR55 como un componente importante en los circuitos moleculares que controlan el comportamiento cancerígeno de las células, así como su implicación indirecta en respuestas angiogénicas (Hofmann et al., 2015) y en fenotipos pro-migratorios de cáncer de mama y cáncer de colon (Ford et al., 2010; Kargl et al., 2016). De hecho, las vías de señalización asociadas con el receptor GPR55 y el fosfolípido LPI están relacionadas con la transmisión de señales oncogénicas, migración y polaridad de las células tumorales (Dorsam and Gutkind, 2007). A pesar de los avances de la última década, el patrón de expresión de GPR55 y su relevancia fisiopatológica, su farmacología y la señalización asociadas siguen siendo motivo de controversia y fuente de gran discusión.

Otro receptor que genera cierta discusión aunque tradicionalmente se ha incluido entre los receptores cannabinoides es el receptor de potencial transitorio V1 (*transient receptor potential vanilloid*, TRPV1), anteriormente llamado receptor de capsaicina o simplemente receptor vaniloide. Este receptor fue inicialmente identificado molecularmente por Caterina y colaboradores en muestras de rata (Caterina et al., 1997). Solo tres años más tarde, Hayes y colaboradores identificaron y clonaron el receptor en humanos (Hayes et al., 2000). Esta proteína constituye un canal catiónico no selectivo de 839 aminoácidos codificado por el gen del mismo nombre y localizado en el cromosoma 17p13.2 humano. Estructuralmente está relacionado con los miembros de la familia de canales iónicos receptores de potencial transitorio (*transient receptor potential*, TRP), que incluye más de 30 miembros, la mayoría de ellos permeables para cationes divalentes y monovalentes como Ca²⁺, Na⁺ y Mg²⁺ (Pedersen et al., 2005). Presenta seis dominios transmembrana con una región porosa entre los segmentos quinto y sexto y con ambos dominios N- y C-terminal citoplasmáticos.

El receptor TRPV1 se describió como un receptor específico para la capsaicina (Morita et al., 2006), principal componente pungente de la cayena, de la guindilla y de otros pimientos picantes. Este compuesto induce una sensación de quemazón dolorosa por activación selectiva de las neuronas sensoriales que informan sobre estímulos nocivos al SNC. Actualmente sabemos que el receptor TRPV1 se encuentra presente en las neuronas

sensoriales de tipo C de la piel, el corazón, los pulmones y los vasos sanguíneos, donde media la respuesta celular inducida por estímulos externos tales como temperatura, luz, presión mecánica y presión osmótica, entre otros. Dichos estímulos provocan el incremento o la disminución de la permeabilidad selectiva de los canales TRP a iones específicos, alterando el potencial de membrana celular que provoca su despolarización (Piper et al., 1999). Se le considera, por tanto, un importante transductor de estímulos químicos y físicos a actividad neuronal.

Tradicionalmente se ha considerado a TRPV1 como un receptor patológico, es decir, que tiene un papel clave en la transducción de los estímulos dolorosos, y de hecho se ha definido su papel pro-inflamatorio en diversas enfermedades. El ratón transgénico que no expresa TRPV1 muestra un aumento del umbral ante un estímulo nociceptivo por calor, una reducción de biomarcadores patológicos como las citoquinas y una disminución de la hinchazón tisular en un modelo murino de inflamación articular (Caterina et al., 2000; Keeble et al., 2005). Sin embargo, además del papel patológico asociado tradicionalmente al receptor, estudios recientes han establecido un papel protector a nivel de sistema cardiovascular y tracto gastrointestinal (Birder et al., 2001; Wang and Wang, 2005) además de un papel fisiológico relevante en neurogénesis (Jin et al., 2004) y termorregulación (Gavva et al., 2007), entre otros procesos. Su inclusión como receptor cannabinoide se debe al hecho de que el endocannabinoide anandamida y algunos de sus análogos actúan como agonistas de TRPV1, tanto en células transfectadas como en células que lo expresan endógenamente (Tóth et al., 2009), aunque con una actividad intrínseca menor a la del agonista capsaicina (Howlett et al., 2002). La unión del endocannabinoide anandamida induce corrientes de calcio en la membrana y un aumento de calcio intracelular. Por el contrario, no es activado ni por 2-AG ni por agonistas no endocannabinoides de CB₁ y CB₂ (Zygmunt et al., 1999), aunque sí que responde a concentraciones micromolares del fitocannabinoide CBD (Bisogno et al., 2001). El único agonista conocido tanto para CB₁ como para TRPV1 es el análogo sintético de la anandamida O-1861 (Di Marzo et al., 2001a). TRPV1 y CB₁ inducen respuestas opuestas a nivel de conductancia de los canales de calcio, es decir, en células que co-expresan ambos receptores como las neuronas ganglionares de la raíz dorsal, el aumento de calcio intracelular inducido por capsaicina puede ser revertido por la activación espontánea de receptores CB₁ (Millns et al., 2001; Ross, 2003). No obstante, la respuesta de TRPV1 a anandamida en condiciones fisiológicas sigue siendo fuente de discusión, debido a que la anandamida es más potente inhibiendo la movilización de calcio que activando los receptores vaniloides.

1.6.1.3. Ligandos cannabinoides

Existe un amplio abanico de agonistas, antagonistas y activadores e inhibidores enzimáticos de elevada potencia y afinidad. En función de su estructura química, podemos dividir los ligandos cannabinoides en cuatro grupos principales (Howlett et al., 2002; Pertwee, 1999):

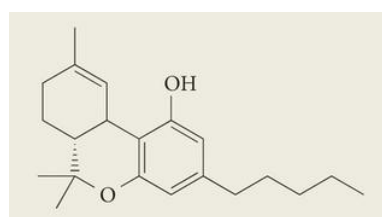
- *ligandos clásicos*: son compuestos derivados del dibenzopirano, pueden ser fitocannabinoides o sus derivados sintéticos. Los miembros más relevantes son los fitocannabinoides Δ^9 -THC y CBD (Figura 24), y HU-210, análogo sintético de (-)- Δ^8 -THC. HU-210 se comporta como un potente agonista de CB₁ y CB₂; mientras, Δ^9 -THC siendo un agonista parcial de ambos receptores, presenta una menor afinidad y una menor actividad

relativa intrínseca. Otro miembro relevante es el ligando JWH-133, agonista del receptor CB₂.

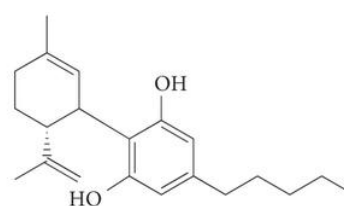
- *ligandos no clásicos*: son análogos bicíclicos o tricíclicos del Δ^9 -THC sin el anillo pirano. Uno de sus miembros es el CP55940, que se une a ambos receptores aunque presenta menor afinidad pero similar actividad relativa intrínseca que el potente agonista sintético HU-210.

- *grupo aminoalquilindol*: estructuralmente muy diferentes de los demás ligandos cannabinoides. El compuesto más estudiado es WIN55212, con actividad intrínseca similar a HU-210 y a CP55940. Diversos estudios muestran una afinidad relativamente superior de este compuesto para CB₂.

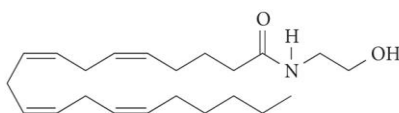
- *grupo eicosanoide*: se encuentra formado por ligandos con estructuras diferentes a los componentes de los tres grupos anteriores. Sus miembros más importantes son los endocannabinoides anandamida y 2-AG (Figura 24) y sus análogos sintéticos. La anandamida es un agonista parcial de CB₁ y CB₂, aunque con menor afinidad y actividad intrínseca para CB₂. El 2-AG también muestra menor afinidad para CB₂, aunque es más potente que la anandamida. Un análogo sintético de la anandamida muy estudiado es el araquidonoil-2'-cloroetilamida (ACEA), agonista que presenta una afinidad significativamente superior por CB₁ que por CB₂.



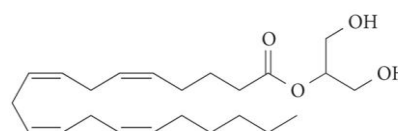
Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)



Cannabidiol (CBD)



Arachidonoyl ethanolamide (anandamide)



2-Arachidonoyl glycerol (2-AG)

Figura 24. Estructura de los dos fitocannabinoides y de las dos moléculas endocannabinoides más representativas. (Extraído y modificado de Mechoulam et al., 2014)

El primer antagonista selectivo para CB₁ que se desarrolló fue el diarilpirazol SR141716A, más conocido como rimonabant (Rinaldi-Carmona et al., 1994), sin afinidad significativa por otros receptores no cannabinoides. A pesar de su selectividad, el rimonabant no es un compuesto específico, de manera que a concentraciones en el rango micromolar, puede actuar como agonista parcial del receptor TRPV1. Otros antagonistas selectivos para CB₁ son AM251, AM281 (análogos estructurales del rimonabant), LY320135 y MK-0364 o taranabant. Todos estos compuestos carecen de la habilidad de activar a CB₁ cuando se administran solos aunque, en tejidos que expresan el receptor CB₁, pueden inducir respuestas opuestas a las inducidas por los agonistas (Pertwee, 2005b), es decir, pueden actuar como agonistas inversos al disminuir la unión espontánea de CB₁ a sus mecanismos efectores en ausencia de agonistas endógenos o administrados de manera exógena.

Por su parte, también se han desarrollado antagonistas selectivos para CB₂, siendo los más relevantes los compuestos AM630 y SR144528. Ambos bloquean la activación inducida por los agonistas de manera competitiva (Howlett et al., 2002; Pertwee, 1999) aunque algunos estudios muestran que pueden actuar como agonistas inversos, (Rinaldi-Carmona et al., 1994; Ross et al., 1999).

Respecto al receptor GPR55, hemos comentado que a pesar de las evidencias que muestran que puede responder a cannabinoides tanto sintéticos como naturales así como a endocannabinoides, la mayoría de estudios convergen en el LPI como único agonista endógeno (Oka et al., 2009; Ross, 2009) y en el compuesto CID16020046 (también llamado ácido benzoico HMOPP o simplemente HBA) como antagonista selectivo (Kargl et al., 2013). Sin embargo, la respuesta de GPR55 a LPI puede ser modulada por endocannabinoides como la anandamida y la virodamina, aumentando el reclutamiento de arrestinas inducido por LPI a bajas concentraciones e inhibiéndolo a elevadas concentraciones (Sharir et al., 2012). Si bien todavía son fuente de discusión, algunos estudios muestran compuestos que pueden unirse tanto a receptores cannabinoides clásicos como a GPR55; el más conocido es el CBD, que puede actuar como agonista inverso de CB₂, antagonista débil de CB₁ y antagonista de GPR55 (Pertwee, 2007; Ryberg et al., 2007; Thomas et al., 2007; Whyte et al., 2009).

A diferencia de los neurotransmisores y neuropéptidos clásicos, los endocannabinoides no se almacenan en vesículas sino que se sintetizan según demanda fisiológica. Sus precursores son fosfolípidos anclados en las membranas celulares procesados por enzimas intracelulares específicas y tras su síntesis, son liberados para su inmediata acción como moléculas de señalización. Tras la recaptación por parte de las células, los endocannabinoides son rápidamente inactivados mediante enzimas hidrolíticas (Wang and Ueda, 2009).

Todos los procesos responsables de la producción, transporte de membrana e inactivación enzimática de los endocannabinoides son procesos finamente regulados (Howlett et al., 2002) y constituyen posibles dianas farmacológicas a través de las cuáles la actividad del sistema puede ser modulada con fines experimentales o terapéuticos. De hecho, esta modulación ocurre *in vivo* como resultado de la liberación conjunta de los endocannabinoides y derivados lipídicos endógenos como es el caso de la palmitoiletanolamida y la oleamida que pueden potenciar a la anandamida, o el 2-linoleil glicerol y el 2-palmitoil glicerol que pueden potenciar al 2-AG (Mechoulam et al., 1998). Este mecanismo de liberación conjunta también recibe el nombre de “efecto séquito” y estaría causado, al menos en parte, por la competencia de los análogos lipídicos por los mecanismos de hidrólisis de los endocannabinoides.

El desafío más importante en la investigación sobre cannabinoides es entender qué interacciones de las observadas son fisiológicamente relevantes. Es necesario discernir, pues, entre aquéllas que son consecuencia de interacciones físicas con las moléculas lipofílicas y las proteínas hidrofóbicas de la membrana en la que se hallan y aquéllas que ocurren bajo patrones concretos de liberación.

1.6.2. Mecanismos de acción de los receptores cannabinoides

La investigación de las últimas dos décadas muestra a los endocannabinoides como potentes reguladores de la función sináptica en el SNC, donde actúan como mensajeros

retrogrados suprimiendo la liberación de neurotransmisores a corto o largo plazo, en sinapsis tanto inhibitoras como excitadoras (Castillo et al., 2012; Katona and Freund, 2012). A principios de la década de los 90, dos grupos de investigación demostraron mediante el estudio de *slices* de cerebro, que la despolarización de neuronas post-sinápticas en el cerebelo y el hipocampo induce la supresión a corto plazo de la transmisión sináptica inhibitoria, fenómeno al que llamaron *depolarization-induced suppression of inhibition* (DSI) (Llano et al., 1991; Pitler and Alger, 1992). El DSI necesita un aumento de Ca^{2+} post-sináptico que conduce a una reducción de la liberación de transmisores pre-sinápticos, es decir, que depende de una señalización retrógrada. Dicha señalización se identificó en 2001, fruto del trabajo coetáneo de dos grupos distintos: por un lado, Ohno-Shosaku y colaboradores en neuronas del hipocampo (Ohno-Shosaku et al., 2001) y por otro Wilson y Nicoll en *slices* de este mismo área (Wilson and Nicoll, 2001). Al mismo tiempo, Kreitzer y Regehr descubrieron que la despolarización de las células de Purkinje cerebelares también provoca una reducción temporal de la señal excitadora en estas células, fenómeno al que llamaron *depolarization-induced suppression of excitation* (DSE), y que también está mediado por endocannabinoides (Kreitzer and Regehr, 2001). Inmersos en esta vorágine de resultados, cabe destacar también que tan solo un año después, en 2002, se reportó la implicación de la señalización retrógrada mediada por endocannabinoides en el fenómeno de LTD en el estriado (Gerdeman et al., 2002) y en el NAc (Robbe et al., 2002).

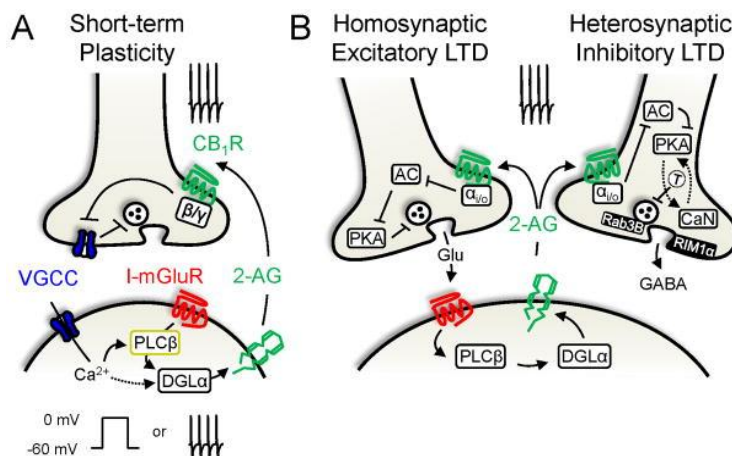


Figura 25. Representación esquemática de los mecanismos moleculares que subyacen a la plasticidad a corto y largo plazo mediada por endocannabinoides. (A) Depresión a corto plazo y (B) Depresión a largo plazo excitadora (LTD) e inhibitoria (iLTD). (Extraído de Castillo et al., 2012)

La localización del receptor CB_1 en terminales neuronales sugiere su importante papel en la regulación de la función sináptica. La activación del receptor CB_1 inhibe la liberación de neurotransmisores en las sinapsis mediante dos mecanismos principales: por un lado la plasticidad a corto plazo, en la que la activación del receptor CB_1 implica la inhibición del flujo de Ca^{2+} pre-sináptico a través de canales dependientes de voltaje (VGCCs) en un mecanismo que depende principalmente de las subunidades $\beta\gamma$ de proteína G; por otro, la plasticidad a largo plazo, que requiere de la inhibición de la enzima AC y la regulación negativa de la vía cAMP/PKA (Castillo et al., 2012). La inhibición de la neurotransmisión debido a mecanismos pre-sinápticos es el efecto electrofisiológico mejor caracterizado de los cannabinoides (Figura 25).

Los endocannabinoides pueden difundir al espacio extracelular donde actuarán como moduladores en terminales sinápticos colindantes. Típicamente, la estimulación aferente repetida causa la liberación de glutamato desde los terminales pre-sinápticos excitadores, activando los terminales post-sinápticos e induciendo la generación y la liberación de 2-AG; éste, a su vez, es capaz de activar los receptores CB_1 del mismo terminal pre-sináptico

(efecto homo-sináptico) o de terminales cercanos (efecto hetero-sináptico) (Ohno-Shosaku and Kano, 2014), inhibiendo la liberación de neurotransmisores. Hay evidencias que sugieren que los endocannabinoides también señalizan de manera no retrógrada o autocrina a través de receptores CB₁ post-sinápticos (Bacci et al., 2004; Marinelli et al., 2009), CB₂ intracelulares (den Boon et al., 2012) y activando receptores TRPV1 (Chávez et al., 2010). También pueden modular la función pre y post-sináptica de manera indirecta a través de células gliales tales como oligodendrocitos (Gomez et al., 2010), astrocitos (Metna-Laurent and Marsicano, 2015) y células microgliales (Hegyí et al., 2012). Es interesante considerar que los astrocitos y las células microgliales en cultivo pueden producir tanto anandamida como 2-AG (Stella, 2009).

El sistema endocannabinoide, pues, se presenta como un importante modulador de la actividad sináptica a través de múltiples y diferentes mecanismos, dando como resultado el incremento o la supresión de la red de actividad general.

1.6.3. Heterómeros de receptores cannabinoides

Son múltiples las evidencias que muestran la existencia de homodímeros del receptor CB₁ (Wager-Miller et al., 2002) y la capacidad de los receptores cannabinoides para formar heterodímeros u oligómeros con uno o más GPCRs con los que se co-expresan. Los estudios de oligomerización se han centrado principalmente en el receptor CB₁ debido a su amplia distribución en el SNC. Así, se ha reportado la formación de diferentes heterodímeros, empezando por el que forma con el propio receptor cannabinoide CB₂ (Callén et al., 2012) y mostrando el mecanismo por el cual el receptor CB₂ puede modular negativamente la acción del receptor CB₁. Se han descrito heterómeros entre el receptor CB₁ y receptores opioides tipo mu, kappa y delta, con posibles implicaciones en el proceso de neuritogénesis (Rios et al., 2006), y heterómeros entre el receptor CB₁ y el receptor de angiotensina tipo 1, mostrando un nuevo mecanismo de modulación importante para entender las propiedades potencialmente patogénicas de la angiotensina tipo 2 (Rozenfeld et al., 2011). También se ha reportado la formación de complejos heteroméricos del receptor CB₁ con el receptor de orexina tipo 1 (Ellis et al., 2006; Ward et al., 2011), siendo estos complejos potencialmente relevantes en la modulación del apetito, la ingesta y el estado de vigilia, y con el receptor de serotonina tipo 2A, implicado en los efectos deletéreos del cannabis sobre la memoria (Viñals et al., 2015). Cabe destacar también la formación de oligómeros entre los receptores CB₁, de adenosina A_{2A} y de dopamina D₂ (Navarro et al., 2008), co-expresados simultáneamente en las neuronas GABAérgicas del estriado y cuya función está particularmente comprometida en la enfermedad de Parkinson y en los primeros estadios de la enfermedad de Huntington.

1.6.4. Papel fisiológico

El sistema endocannabinoide está implicado en numerosos aspectos de las funciones neurales tales como aprendizaje y memoria, ansiedad, depresión, adicción, comportamientos relacionados con la ingesta y el apetito, dolor y neuroprotección (Kano et al., 2009).

1.6.4.1. Memoria y aprendizaje

Desde hace mucho tiempo se conocen los efectos negativos del consumo de Δ^9 -THC sobre la memoria en humanos. A nivel de laboratorio los efectos de la administración de agonistas cannabinoides se han estudiado usando diversos paradigmas de aprendizaje y memoria, revelando que principalmente la memoria a corto plazo y la memoria de trabajo son las más afectadas. En estudios de memoria espacial, mediante la realización de la tarea del laberinto de agua o laberinto de Morris, se ha observado que la administración de agonistas cannabinoides afecta negativamente a la memoria (Varvel and Lichtman, 2002). En estudios de memoria de trabajo, en que la plataforma en el laberinto de Morris cambia de localización, se ha observado que los cannabinoides también afectan negativamente este proceso (Varvel et al., 2005). Los resultados sugieren que el sistema endocannabinoide está implicado en la extinción de la memoria espacial, efectos que se relacionan con su función hipocampal (Robinson et al. 2008).

Los efectos de la administración de cannabinoides también se han estudiado a nivel de memoria aversiva, de manera que en un paradigma de miedo condicionado, la administración del agonista WIN55212 afecta de manera selectiva a la adquisición de la memoria aversiva dependiente de la función hipocampal en ratas (Pamplona et al., 2006). Además, como en el paradigma antes mencionado, el ratón KO para CB_1 muestra una adquisición normal pero una fuerte afectación del proceso de extinción (Marsicano et al., 2002).

1.6.4.2. Ansiedad

La ansiedad se define comúnmente como un componente adaptativo de la respuesta al estrés frente a circunstancias que ponen en peligro la integridad individual. Si la respuesta es desproporcionada en intensidad y duración o deja de estar asociada a un riesgo real, pasa a ser una expresión patológica no adaptativa que conlleva sufrir perturbaciones emocionales e incluso puede convertirse en un desorden psiquiátrico.

El principal atractivo del uso recreativo del cannabis son sus efectos euforizantes. Estos efectos pueden ir acompañados por una disminución de la ansiedad y un aumento de la percepción, sociabilidad y creatividad aunque el cannabis también puede producir reacciones disfóricas, ansiedad, agitación, pánico, fobia, paranoia, psicosis y disfunción cognitiva (Dannon et al., 2004; D'Souza et al., 2004). Estos efectos *a priori* contradictorios se podrían explicar por un comportamiento bidireccional de los cannabinoides, de manera que a dosis bajas producen efectos ansiolíticos (Patel and Hillard, 2006) mientras a dosis más altas sus efectos son ansiogénicos (Genn et al., 2004). Los datos existentes muestran que el consumo de cannabis y su dependencia aumentan el riesgo de padecer desórdenes de pánico (Zvolensky et al., 2008) y diversos estudios sugieren que el consumo crónico exacerba las manifestaciones de ansiedad y depresión mientras reduce la eficacia terapéutica de los agentes ansiolíticos (Ashton et al., 2005; Strakowski et al., 2007). Los agonistas cannabinoides, pues, inducen efectos complejos y a veces contradictorios a nivel de ansiedad tanto en humanos como en animales de experimentación.

También se ha estudiado el papel fisiológico de los cannabinoides en la regulación de la ansiedad mediante el uso de antagonistas y ratones KO para CB_1 . El antagonista

rimonabant produce efectos ansiogénicos en ratones sometidos a tareas como el laberinto en cruz elevado y tests de vocalización (Arévalo et al., 2001), de la misma manera que el ratón KO muestra comportamientos ansiogénicos en el laberinto en cruz elevado, la caja luz-oscuridad y en tareas de interacción social (Urigüen et al., 2004). Estos resultados muestran la existencia de un tono ansiolítico cannabinoide endógeno.

Por otra parte, aunque menos estudiado, existen evidencias recientes del papel de los receptores CB₂ en la modulación de los desórdenes por ansiedad. De hecho, la inyección de secuencias nucleotídicas *antisense* de CB₂ en el cerebro provoca efectos ansiolíticos en roedores (Onaivi et al., 2008) mientras que se ha descrito que la sobre-expresión de receptores CB₂ reduce los comportamientos asociados con la ansiogénesis en los paradigmas de ansiedad condicionada estudiados mediante las tests de luz-oscuridad y el laberinto en cruz elevado, además de alterar los efectos ansiolíticos de las benzodiacepinas (García-Gutiérrez and Manzanares, 2011). El bloqueo crónico de CB₂ produce también efectos ansiolíticos mediados por la alteración de la función de los receptores GABA_A (García-Gutiérrez et al., 2012).

La acción bidireccional de los cannabinoides en las respuestas a ansiedad se relaciona con el papel modulador sobre la liberación de GABA y glutamato en la amígdala basolateral y el hipocampo, entre otras áreas prosencefálicas (Azad et al., 2004; Katona et al., 2001). La activación de receptores CB₁ en el hipocampo, donde se expresan de manera selectiva en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas inhibitorias, reduce la liberación de GABA de los terminales pre-sinápticos, aumentando por tanto la excitabilidad de las neuronas piramidales y la ansiedad. También se ha reportado la implicación de los receptores CB₁ en la regulación de otros substratos neuroquímicos de la ansiedad, incluyendo neurotransmisores como la serotonina, la noradrenalina y la acetilcolina, además de hormonas del estrés, colecistoquinina y péptidos opioides (Szabo and Schlicker, 2005). Por otra parte, la activación de receptores sensibles a cannabinoides pero diferentes de receptores CB₁ (presumiblemente receptores TRPV1) presentes en el hipocampo en terminales excitadores inducen la supresión de la liberación de glutamato (Hájos and Freund, 2002), requerida para la supresión de la ansiedad. Una regulación similar se observa también en la amígdala basolateral (Pistis et al., 2004), mostrando las diferentes características farmacológicas de receptores CB₁ y TRPV1.

1.6.4.3. Depresión

La depresión es un desorden mental común caracterizado por un humor decaído, pérdida de interés en el placer, sentimientos de culpa y baja autoestima, trastorno de sueño y apetito, baja energía y falta de concentración. A diferencia del sentimiento depresivo o triste, que es debido a una causa particular, una persona que sufre depresión puede experimentar además experiencias intensas de ansiedad, soledad y negatividad, entre otras, siendo la depresión un síndrome heterogéneo fruto de diferentes causas y fisiopatologías y no una enfermedad única. Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que entre el 40 y el 50% del riesgo de padecer depresión es genético (Lohoff, 2010).

En estudios farmacológicos en animales de experimentación se ha establecido que la activación de los receptores CB₁ tiene efectos anti-depresivos y los datos sugieren que es fruto de su asociación con cambios en la actividad de las vías monoaminérgicas. Así, en ratones sometidos al test de nado forzado, la administración del agonista de CB₁ HU-210

reduce el tiempo de inmovilización, mimetizando los efectos del anti-depresivo desipramina (Hill and Gorzalka, 2005). Estos efectos se relacionan con el incremento de noradrenalina (Oropeza et al., 2005) y dopamina (Pistis et al., 2002) observados en la PFC tras la administración del agonista de CB₁ WIN55212 o de Δ^9 -THC, así como el incremento en la actividad de las neuronas noradrenérgicas del LC (Muntoni et al., 2006).

La administración de antagonistas de receptores CB₁ tiene efectos depresivos, siendo el ejemplo más conocido el caso del antagonista rimonabant usado principalmente como agente anti-obesidad y que aumenta la incidencia de depresión y suicidio (Christensen et al., 2007; Mitchell and Morris, 2007).

Aunque los efectos anti-depresivos de los cannabinoides son claros, se han reportado excepciones, que lejos de ser contradictorias, pueden ser el resultado del comportamiento bifásico dependiente de la dosis y las condiciones experimentales, como sucede en los modelos de ansiedad.

1.6.4.4. Adicción

La primera evidencia clara del papel modulador de los cannabinoides en la búsqueda de drogas fue la observación de que el potente agonista de CB₁ HU-210 es capaz de restablecer la búsqueda de cocaína pasadas tres semanas tras la extinción de la auto-administración intravenosa en ratas, mientras que este efecto es completamente eliminado por el antagonista rimonabant (De Vries et al., 2001).

Son diversos los estudios que establecen que los ratones KO para el receptor CB₁ muestran alteraciones en los comportamientos relacionados con el sistema de recompensas y la búsqueda de drogas en respuesta a múltiples sustancias como el etanol, la nicotina, la anfetamina, la cocaína u otros psicoestimulantes (Okahisa et al., 2011). Tanto en ratones KO para CB₁ como en ratones WT a los que se les administra el antagonista de CB₁ rimonabant se ve reducida la preferencia, es decir, los efectos relacionados con la recompensa, en el paradigma de preferencia de lugar condicionada a nicotina o en auto-administración de esta droga (Castañé et al., 2002; Cohen et al., 2002), o en el test de dos botellas a libre elección con etanol (Wang et al., 2003). En el caso de los psicoestimulantes, el bloqueo de los receptores CB₁ puede provocar efectos distintos dependiendo del paradigma estudiado.

La activación de receptores CB₁ en regiones del cerebro claves para los comportamientos relacionados con la recaída a la búsqueda de drogas como la PFC, la amígdala, el NAc, el estriado y el hipocampo, induce la modulación de la liberación de diversos neurotransmisores, incluyendo GABA, dopamina y glutamato, todos ellos implicados en el restablecimiento de la búsqueda de drogas. Los receptores CB₁ presentan una fuerte expresión en los terminales de las interneuronas GABAérgicas en todo el SNC, y su activación provoca la inhibición de la liberación de GABA (Katona et al., 1999; Manzoni and Bockaert, 2001). La liberación de dopamina por parte de las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan hacia el NAc se relaciona positivamente con la motivación e incentivo de las drogas de abuso (Robinson and Berridge, 1993; Wise, 2004). A nivel de VTA, la liberación de GABA provoca la inhibición de la actividad de estas proyecciones dopaminérgicas de la vía mesolímbica, de manera que la activación aquí de los receptores

CB₁ induce de manera indirecta el aumento de la liberación de dopamina (Tanda et al., 1997).

Estudios clínicos y preclínicos sugieren, pues, que los antagonistas de CB₁ pueden ser útiles para el tratamiento de los comportamientos adictivos.

1.6.4.5. Apetito y comportamientos relacionados con la ingesta

La estimulación del apetito es uno de los efectos más conocidos asociados al consumo de cannabis en humanos. Hoy en día se conoce la implicación del sistema endocannabinoide en la regulación del apetito, la ingesta y el metabolismo energético (Kim et al., 2011; Tibiriça, 2010) y sus componentes se presentan como dianas terapéuticas en el tratamiento de la obesidad (Cota, 2007).

El control de la ingesta ejercido por el sistema endocannabinoide parece fruto, por una parte, del refuerzo de la motivación por encontrar y consumir comida y, por otra parte, de la inducción del apetito mediante la regulación de los niveles y los efectos del sistema orexinérgico y anorexinérgico (Di Marzo and Matias, 2005; Monteleone et al., 2005). En esta misma línea, a nivel central se sabe que en condiciones de ayuno se produce un incremento en los niveles de endocannabinoides en áreas límbicas prosencefálicas y en el hipotálamo, y que la administración de 2-AG en el NAc estimula los comportamientos relacionados con la ingesta (Kirkham et al., 2002). Además, la hormona anorexigénica leptina reduce los niveles de endocannabinoides en el hipotálamo (Di Marzo et al., 2001b).

Estudios con antagonistas de los receptores cannabinoides han demostrado mejoras significativas a nivel de pérdida de peso y control del apetito en humanos, aunque con efectos secundarios indeseables que incluyen problemas cardiovasculares y trastornos psiquiátricos severos como depresión con un aumento de pensamientos suicidas. El caso más conocido es el del antagonista de CB₁ SR141716, rimonabant, comercializado como un inhibidor del apetito bajo el nombre de Acomplia^{TS}. La Agencia Europea del Medicamento aprobó su uso en 2006 pero solo dos años más tarde lo retiró del mercado (Di Marzo and Després, 2009).

1.6.4.6. Dolor

Los efectos anti-nociceptivos de los cannabinoides han sido ampliamente descritos y demostrados en modelos animales usando diferentes tipos de estímulos dolorosos. La administración sistémica de cannabinoides suprime las reacciones de comportamiento asociadas a los estímulos dolorosos agudos, al dolor inflamatorio y al daño nervioso de manera comparable al de los opiáceos, tanto en potencia como en eficacia. Numerosos estudios han demostrado que los efectos anti-nociceptivos de los cannabinoides están mediados por mecanismos distintos de los responsables de otros de sus efectos comportamentales; la administración de Δ^9 -THC induce una eficacia analgésica adictiva que es bloqueada por antagonistas de los receptores kappa opioides, que no bloquean, en cambio, sus efectos psicoactivos (Welch, 1993).

La implicación de los endocannabinoides también se ha demostrado a nivel central en ciertas formas de analgesia inducida por estrés (supresión de la sensación de dolor como respuesta adaptativa al estrés) y mediada por receptores CB₁ (Hohmann et al., 2005). Por otra parte, también se ha demostrado la inducción de analgesia tras la activación de receptores CB₂, que conlleva la liberación de beta-endorfinas en los queratinocitos humanos (Ibrahim et al., 2005).

Los cannabinoides, pues, juegan un papel importante en la modulación endógena del dolor, es decir, en la nocicepción homeostática, y la administración exógena de cannabinoides puede ofrecer potencialmente cierto grado de analgesia ante diferentes estados de dolor (Pertwee, 2001). Y así se sugiere en estudios clínicos recientes con medicamentos basados en cannabis, en los que los agonistas cannabinoides se muestran efectivos para reducir el dolor en humanos (Ashton et al., 2005; Rog et al., 2005). También podría ser efectiva la inhibición de la degradación de endocannabinoides, que además minimizaría los efectos adversos asociados ya que se maximizarían los efectos en las regiones de producción y liberación (Hohmann and Suplita, 2006).

1.6.4.7. Neuroprotección

Los endocannabinoides y la administración de cannabinoides exógenos son capaces de ejercer neuroprotección en gran variedad de modelos de excitotoxicidad y neurodegeneración tanto *in vitro* como *in vivo* (van der Stelt and Di Marzo, 2005).

La excitotoxicidad es un proceso patológico en el que la sobre-activación excesiva de las neuronas por parte de neurotransmisores excitadores conlleva una elevación excesiva de los niveles de Ca²⁺ intracelular, causando daños metabólicos y eventualmente, la muerte celular. Numerosas evidencias experimentales sugieren que el daño neuronal causado por excitotoxicidad es clave en la muerte celular y la fase aguda de la neurodegeneración, y que además puede sensibilizar a las células ante mecanismos tardíos como la inflamación o la apoptosis. De hecho, la hipótesis de la excitotoxicidad forma parte de las bases neuroquímicas comunes para explicar los desórdenes neurodegenerativos crónicos tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, entre otros. Al producirse excitotoxicidad, la muerte celular se inicia mediante sobre-estimulación de los receptores de glutamato ante las elevadas concentraciones extracelulares de este neurotransmisor. En consecuencia, la concentración de calcio se eleva hasta niveles citotóxicos, activándose vías que incluyen caspasas, calpaínas y especies reactivas de oxígeno (Dirnagl et al., 1999; Kermer et al., 1999). Numerosos estudios han establecido efectos neuroprotectores tanto de los endocannabinoides clásicos como de cannabinoides sintéticos en modelos de excitotoxicidad (van der Stelt et al., 2002), así como en modelos de neurodegeneración (Mechoulam et al., 2002; van der Stelt et al., 2002). Los niveles de 2-AG, anandamida y su precursor N-araquidonoilfosfatidil-etanolamina, que normalmente se encuentran en bajas concentraciones en el cerebro, aumentan notablemente tras un daño neuronal (Berger et al., 2004; Franklin et al., 2003; Muthian et al., 2004). Además, ante una isquemia focal permanente en el cerebro de ratones KO para los receptores CB₁ aumenta el tamaño del infarto y la mortalidad, y tras una isquemia focal transitoria los déficits neurológicos consecuentes son más severos, el flujo de sangre en la zona isquémica durante la reperfusión se reduce y la neurotoxicidad inducida por NMDA aumenta (Parmentier-Batteur et al., 2002), todo ello en comparación con los ratones WT. Siguiendo esta misma línea, la

administración de 2-AG reduce el edema tras un daño cerebral y este efecto puede ser atenuado de manera dosis-dependiente con la administración del antagonista selectivo de CB₁ rimonabant (Panikashvili et al., 2001). Aún así, el rimonabant solo no produce un aumento del volumen del tejido con edema, sugiriendo que la liberación endógena de 2-AG también ejerce sus efectos neuroprotectores a través de mecanismos mediados por receptores cannabinoides diferentes de los receptores CB₁.

También se ha descrito el importante papel neuroprotector del receptor CB₂ en procesos neurodegenerativos, inflamatorios e inmunes. La regulación de la actividad microglial mediante agonistas selectivos del receptor CB₂ reduce la neurodegeneración estriatal en la enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009) y el daño inducido en el SNC por inflamación en modelos de esclerosis múltiple en ratones (Maresz et al., 2007). Su papel como inmunomodulador se ha descrito tanto a nivel periférico como central (Lehmann et al., 2012; Ramirez et al., 2012).

1.7. Enfermedad de Huntington

1.7.1. Etiología y síntomas

Las primeras referencias de la enfermedad datan del antiguo Egipto, donde se cita la pérdida de voluntariedad en los movimientos, aunque la asociación con el sistema nervioso central llegó en el siglo XVI de la mano de Paracelso, que describió una epidemia de “manía danzatoria” no relacionada con espíritus ni fantasmas sino con afectaciones de la personalidad de los pacientes, y acuñó el término *corea* para definir el desorden del movimiento. Así, en la descripción de los juicios de Salem (Massachusetts, inicios de 1690) al menos uno de los procesados por brujería padecía de *corea* o *baile de San Vito*. Por lo tanto, si bien George Huntington no fue el primero en describir la enfermedad, su artículo *On Chorea* publicado en 1872 (Huntington G, 1872) fue el primero en describir de manera clara y entendedora la sintomatología clínica de la forma adulta de la enfermedad además de poner de manifiesto su patrón de herencia. El redescubrimiento de los trabajos de Mendel a principios del siglo XX permitió reconocer que la enfermedad seguía claramente un patrón de herencia mendeliana dominante. Más adelante, Hoffmann y colaboradores describieron la forma juvenil de la enfermedad, con un inicio previo a los 21 años y la posibilidad de cursar con síntomas muy diferentes a los del desorden de inicio adulto.

Hoy sabemos que la enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo que cursa con un patrón de herencia autosómico dominante que, según la OMS, afecta por igual a hombres y mujeres en todo el mundo con una incidencia de entre 5 y 7 casos por cada 100.000, calculada en países occidentales. Se manifiesta típicamente entre los 30 y los 45 años, siguiendo su curso durante unos 15 o 20 años, aunque también existe una forma juvenil de la enfermedad, llegando raramente los pacientes a la edad adulta. La enfermedad se caracteriza por una neurodegeneración progresiva que se manifiesta en alteraciones psiquiátricas, impedimentos motores y un declive cognitivo.

La enfermedad está causada por una expansión inestable de tripletes CAG en la región codificante del gen *HTT* o *HD*. Este gen fue clonado el año 1993 por el Grupo de colaboración para la enfermedad de Huntington, compuesto por seis laboratorios distintos. El gen se localiza en el cromosoma 4p16.3 en humanos y codifica para la proteína huntingtina, de 348 KDa y un alto grado de conservación entre especies. La proteína se

expresa de manera ubicua tanto en humanos como en roedores, con altos niveles en las neuronas del SNC y en particular en las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza que proyectan hacia el estriado (Ferrante et al., 1997; Fusco et al., 1999; Trotter et al., 1995). En condiciones normales, la huntingtina presenta entre 9 y 35 repeticiones del triplete CAG mientras que en estado patológico presenta entre 35 y 39 repeticiones con penetrancia variable en la enfermedad, dependiente de la edad y más de 40 repeticiones con penetrancia total, implicando un fragmento elongado de glutaminas en su extremo N-terminal (The Huntington's disease collaborative Research group, 1993). A pesar del papel clave de la mutación en el gen *HD*, hoy en día se conocen diversos polimorfismos genéticos adyacentes a las repeticiones CAG que pueden influenciar el inicio de la enfermedad a través de varios mecanismos, entre ellos excitotoxicidad, alteraciones metabólicas y transcripcionales, proteínas desplegadas y estrés oxidativo (Andrew et al., 1994; Vuillaume et al., 1998). Aunque existe una correlación entre el número de repeticiones CAG y la edad de aparición de los primeros síntomas motores, la realidad muestra grandes diferencias entre pacientes, tanto en la edad de inicio como en las manifestaciones de la enfermedad aún teniendo un número de repeticiones similar. La consecuencia de la mutación en el gen *HD* es una neurodegeneración masiva en el cerebro caracterizada por una pérdida predominante aunque no única de neuronas de proyección en los núcleos caudado y putamen de los ganglios basales, responsable principal de los clásicos síntomas de la enfermedad (Reiner et al., 1988). En estados iniciales la enfermedad se asocia con alteraciones emocionales, psiquiátricas y cognitivas progresivas, produciéndose una pérdida de peso, alteraciones en el comportamiento sexual y en el ciclo sueño-vigilia, relacionadas parcialmente con la disfunción hipotalámica (Politis et al., 2008), mientras en estados tardíos, la enfermedad se caracteriza por síntomas motores (corea, distonía, bradiquinesia, rigidez), demencia progresiva y el empeoramiento gradual de los procesos mentales implicados en comprensión, razonamiento, juicio y memoria (Rosenblatt, 2007).

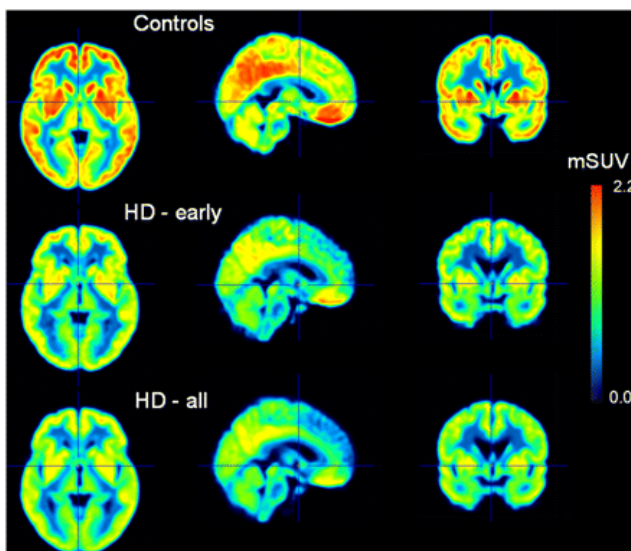


Figura 26. Imágenes de PET (*Positron Emission Tomography*) del cerebro de individuos sanos y pacientes de enfermedad de Huntington. Las imágenes reflejan la disminución en pacientes de la expresión del receptor CB₁, cuantificado por la unión al radioligando ¹⁸F-MK9470. (Extraído de Van Laere et al., 2010).

Para establecer la severidad de la neurodegeneración, el neuropatólogo Jean Paul Vonsattel estableció un sistema de grados basado en el patrón de degeneración estriatal en tejidos *post mortem*. Así, el grado 0 es indistinguible de los cerebros normales tras la exploración general, aunque mediante exploración histológica se puede cuantificar entre un 30 y un 40% de pérdida neuronal en el núcleo caudado; en el grado 1 se observa atrofia, pérdida neuronal y astrogliosis en este mismo núcleo; los grados 2 y 3 se caracterizan por una atrofia general y progresiva del estriado, mientras en el grado 4, el de más severidad, se observa atrofia y pérdida neuronal de hasta un 95% (Vonsattel et al., 1985). La

enfermedad de Huntington es clínicamente compleja y heterogénea y aunque el estriado es la región más afectada, múltiples estudios neuropatológicos muestran que en los pacientes de grado 3 y 4 también se ven profundamente afectadas la corteza cerebral, el globo pálido, el tálamo, la sustancia nigra, núcleos subtalámicos, el hipotálamo y el cerebelo (Kassubek et al., 2004; Niccolini and Politis, 2014) (Figura 26).

1.7.2. Huntingtina y mecanismos de neurodegeneración

Actualmente se acepta que la enfermedad ocurre como consecuencia de la secuencia de poliglutaminas superior a 35 repeticiones presente en el extremo N-terminal de la proteína huntingtina (Figura 27).

En el interior celular, la huntingtina WT se asocia con diferentes orgánulos, incluyendo el núcleo, el RE, el aparato de Golgi y las mitocondrias (Hoffner et al., 2002; Kegel et al., 2002; Panov et al., 2002; Strehlow et al., 2007) y a nivel neuronal se ha descrito su presencia en neuritas y sinapsis, asociada a estructuras vesiculares (Bulgari et al., 2017). La proteína huntingtina WT está implicada en el desarrollo embrionario, teniendo en cuenta que su completa inactivación en el ratón KO causa la muerte del embrión a día 8.5, justo antes de la gastrulación y la formación del SNC (Ochaba et al., 2014). Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran también la implicación de la huntingtina WT en la inhibición de la apoptosis; a modo de ejemplo, bloquea la formación del apoptosoma y la consecuente activación de las caspasas 3 y 9 (Saudou and Humbert, 2016), además de interactuar físicamente con la caspasa-3 inhibiendo su actividad proteolítica (Zhang et al., 2006b) y participar en la vía PI3K-Akt, estimulando la expresión de genes pro-supervivencia y suprimiendo la expresión de genes pro-apoptosis (Saudou and Humbert, 2016). También se ha descrito su papel en los procesos de endocitosis mediados por clatrina, morfogénesis, regulación transcripcional y transporte vesicular (Saudou and Humbert, 2016). De hecho, la huntingtina se encuentra de forma predominante en el citoplasma neuronal, especialmente en compartimentos que contienen proteínas asociadas con las vesículas y está implicada en el tráfico axonal rápido de las mitocondrias (Bulgari et al., 2017).

La huntingtina mutada puede interactuar con proteínas reguladoras de la transcripción y el fragmento elongado de poliglutaminas facilita las interacciones con proteínas asociadas a la huntingtina que se expresan en estriado y corteza, como la calmodulina o la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Sari, 2011). Estas interacciones inducen alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, el tráfico intracelular y la transcripción génica, conllevando la toxicidad característica en la enfermedad de Huntington (Sari, 2011).

A nivel de homeostasis de Ca^{2+} intracelular, diversas evidencias muestran que la huntingtina mutada induce la disfunción mitocondrial, posiblemente debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Oliveira, 2010). Otra posibilidad es la liberación masiva de Ca^{2+} mitocondrial que lleva a la apoptosis debido a una sobreestimulación de receptores de glutamato NMDA y mGluR5 por una liberación excesiva de este neurotransmisor. El exceso de glutamato se relaciona con un déficit de transportadores como el del transportador de glutamato glial tipo 1 (GLT1), déficit asociado con los mecanismos moleculares alterados por la huntingtina mutada en astrocitos (Estrada-Sánchez and Rebec, 2012). De hecho, se ha observado un aumento en la sensibilidad de los receptores NMDA y un incremento de las corrientes evocadas por dichos receptores en neuronas del estriado procedentes de ratones que expresan la

secuencia completa de la huntingtina mutada (Fan and Raymond, 2007). El resultado es un aumento de Ca^{2+} citosólico y un aumento, por tanto, de Ca^{2+} mitocondrial, que conlleva la liberación de citocromo C y la consecuente inducción de la apoptosis por activación de la vía de las caspasas (Sari, 2011). La asociación de la enfermedad con la alteración de la recaptación de glutamato y la consecuente excitotoxicidad está hoy en día aceptada aunque existen ciertas discrepancias. Un estudio reciente usando el sensor optogenético *intensity-based glutamate-sensing fluorescent reporter* (iGluSnFR) en *slices* de estriado procedentes de un modelo de ratón para la enfermedad de Huntington ha revelado que la recaptación de glutamato desde el espacio inter-sináptico es normal o incluso acelerada (Parsons et al., 2016). Las posibles discrepancias entre estudios pueden deberse al hecho de que la gran mayoría de ellos se han realizado clásicamente en sinaptosomas, que sobre-representan la recaptación del terminal neuronal sobre la recaptación astrocítica, aunque en todo caso los resultados sugieren un replanteamiento de la contribución de estos mecanismos en la patogénesis de la enfermedad.

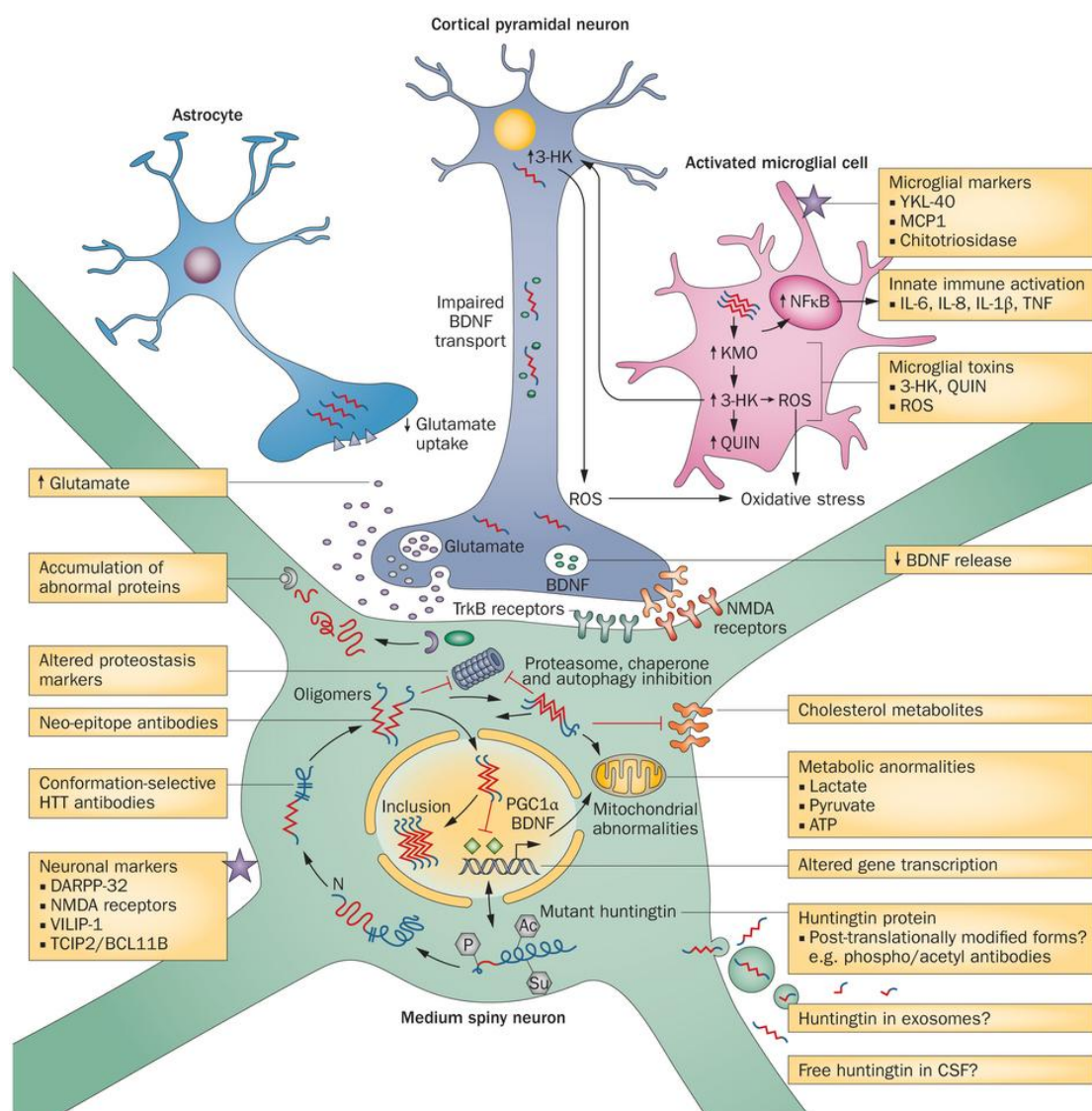


Figura 27. Diagrama esquemático de la patogénesis celular de la enfermedad de Huntington. (3-HK, 3-hydroxykynurenine; Ac, acetyl group; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; CSF, cerebrospinal fluid; KMO, kyurenine mono-oxidase; NMDA, N-methyl-D-aspartate; P, phosphate group; QUIN, quinolinic acid; ROS, reactive oxygen species; Su, SUMO post-translational modifications; TNF, tumour necrosis factor). (Extraído de Ross et al., 2014)

A nivel de tráfico intracelular, la huntingtina mutada desregula el proceso de endocitosis al interactuar con proteínas que actúan como factores accesorios a la endocitosis de vesículas sinápticas mediadas por clatrina (Harjes and Wanker, 2003). Además, la huntingtina mutada no puede estabilizar con el complejo formado por las proteínas dineína-dinactina, alterando el transporte vesicular a través de los microtúbulos (Harjes and Wanker, 2003). Así, la huntingtina mutada induce alteraciones en el transporte anterógrado y retrógrado celular, en el que están implicados factores neurotróficos claves para la supervivencia celular. Un ejemplo es el caso del BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), una proteína miembro de la familia de neurotrofinas ampliamente representada en diversas regiones de SNC. En el periodo prenatal, BDNF está implicada en múltiples estadios de la formación de la red neuronal mientras que en el periodo postnatal está implicada en neurogénesis y neuroprotección (Levada and Cherednichenko, 2015). Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* muestran que la huntingtina WT estimula la producción de BDNF en la corteza actuando a nivel de transcripción génica (Zuccato et al., 2001); de hecho, en ratones que carecen de huntingtina así como en ratones KO heterocigotos para la proteína, se observan niveles reducidos del mRNA de BDNF (Zuccato et al., 2007). Además, esta neurotrofina co-localiza con la huntingtina en las neuronas de la corteza que proyectan al estriado (Saudou and Humbert, 2016), de manera que la pérdida o la reducción de actividad de la huntingtina disminuyen tanto la producción como la liberación al estriado de BDNF, contribuyendo a la degeneración selectiva de estas neuronas (Gauthier et al., 2004; Zuccato and Cattaneo, 2007; Zuccato et al., 2008).

A nivel nuclear, la huntingtina mutada también afecta la transcripción génica debido a la formación de agregados intranucleares y al secuestro de factores de transcripción como p53, CREB-binding protein (CBP) o TATA-binding protein (TBP), entre otros (Landles and Bates, 2004).

1.7.3. Ganglios basales; poblaciones neuronales afectadas

El proceso de neurodegeneración se inicia típicamente en el núcleo caudado y el putamen, con gliosis reactiva y distrofia en las neuritas de las neuronas. El avance de la enfermedad hace que los signos de la patología progresen hacia el caudado rostral y el putamen ventral en primera instancia, y en pacientes avanzados se observe una expansión de los ventrículos laterales y una dramática degeneración de neuronas en las regiones adyacentes al estriado y en la corteza cerebral, incluyendo regiones frontales, parietales y temporales.

A nivel celular, la enfermedad de Huntington se caracteriza por una vulnerabilidad diferencial de subpoblaciones neuronales específicas tanto en el estriado como en la corteza. El estriado es el componente principal de los ganglios basales y aunque presente unos principios comunes a nivel de organización anatómica, es en realidad una estructura heterogénea. La división principal corresponde a la zona dorsal, que comprende el núcleo caudado y el putamen, y la zona ventral, conocida también como NAc. El estriado está compuesto mayoritariamente por neuronas de proyección llamadas *medium spiny neurons* (MSNs) que comprenden aproximadamente el 95% del total de neuronas estriatales, y por una pequeña población de interneuronas, que representan aproximadamente un 5% del total. Mediante microscopia electrónica y tinción de Golgi se han identificado las características morfológicas y bioquímicas únicas de los distintos tipos de neuronas. Las MSNs son neuronas GABAérgicas de largos axones, somas de tamaño medio y dendritas con múltiples espinas (Bolam et al., 2000) que proyectan hacia el globo pálido (GP) y la

substantia nigra pars reticulata (SNr), principales *outputs* de los ganglios basales. Por su parte, las interneuronas presentan axones cortos, somas alargados y una extensa arborización dendrítica, siendo elementos clave del circuito estriatal local (Kawaguchi et al., 1995). En función de sus dianas, distinguimos entre las MSNs de la vía directa, que proyectan al GP interno y a la SNr y expresan de manera preferencial péptido dinorfina y sustancia P, y las MSNs de la vía indirecta, que proyectan al GP externo y expresan preferentemente encefalina.

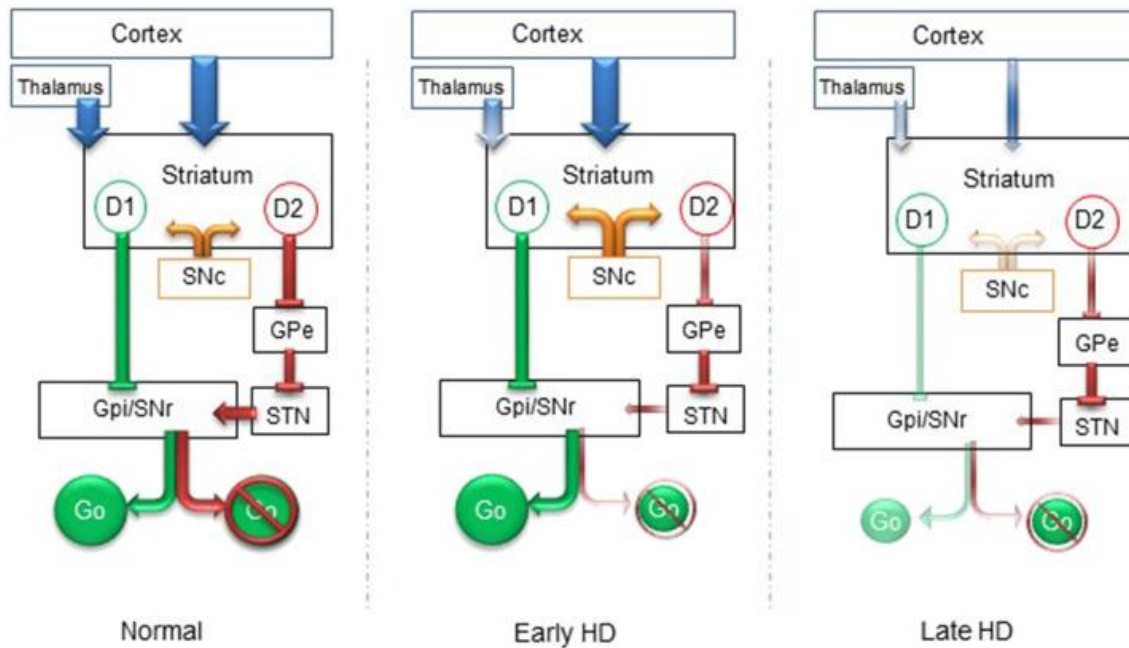


Figure 28. Representación esquemática de las principales conexiones en los ganglios basales y cambios en estadios iniciales y tardíos de la enfermedad de Huntington. (Extraído de Raymond L.A., 2017)

El modelo canónico de la función de los ganglios basales propone que las vías directa e indirecta actúan de manera opuesta y paralela con el fin de ajustar la magnitud de la señal de salida del GP interno/SNr para inhibir o liberar el movimiento (Nelson and Kreitzer, 2014). Según este modelo, la activación de la vía directa lleva a la desinhibición tálamo-cortical y por tanto a la facilitación de la actividad motora, mientras la activación de la vía indirecta conlleva la inhibición tálamo-cortical y por tanto la atenuación del movimiento (Nelson and Kreitzer, 2014). El desequilibrio en la actividad de las vías directa e indirecta permite explicar las alteraciones motoras asociadas con el daño en los ganglios basales como la bradiquinesia en la enfermedad de Parkinson y los movimientos coreiformes en la enfermedad de Huntington. Son las MSNs de la vía indirecta las que constituyen el principal y el más temprano tipo celular afectado en la enfermedad de Huntington (Han et al., 2010; Kreitzer, 2009). En estadios iniciales la degeneración afecta también a las neuronas corticales glutamatérgicas que proyectan al estriado, afectación asociada con las deficiencias cognitivas y las alteraciones psicológicas que aparecen en los pacientes (Sagredo et al., 2012). A medida que progresa la enfermedad, se observa la pérdida de neuronas corticales de las capas III, V y VI así como neuronas del tálamo, hipotálamo, GP y otros núcleos subcorticales, llevando a una atrofia generalizada de la sustancia gris en estadios avanzados de la enfermedad (Raymond, 2017) (Figura 28).

1.7.4. Cannabinoides en la enfermedad de Huntington

Los cannabinoides han sido estudiados en la enfermedad de Huntington principalmente por el alivio de los síntomas hiperkinéticos, teniendo en cuenta su efecto inhibitorio sobre el movimiento. Además, se han obtenido resultados prometedores en células y modelos animales asociados a sus propiedades anti-inflamatorias, neuroprotectoras y neuroregenerativas (Sagredo et al., 2012).

La pérdida de fibras que expresan receptores CB₁ en los ganglios basales es una de las alteraciones neuroquímicas que preceden al desarrollo de esta neuropatología estriatal. La reducción notable en la expresión de receptores CB₁ se ha reportado tanto en pacientes mediante técnicas de neuroimagen (Van Laere et al., 2010) y en cerebros *post mortem* (Glass et al., 2000) como en modelos animales (Lastres-Becker et al., 2002a, 2002b). La pérdida de fibras conlleva además de la reducción de receptores CB₁, la reducción de los niveles de endocannabinoides, contribuyendo a la hiperquinesia típica de la primera fase de la enfermedad (Dowie et al., 2009; McCaw et al., 2004). Recientemente se ha demostrado que la pérdida de receptores CB₁ es un efecto directo que ejerce la huntingtina mutada a través de las mismas señales intracelulares que controlan la expresión de BDNF, como el factor REST (*repressor element 1 silencing transcription factor*) (Blázquez et al., 2011).

El receptor CB₂ es otra diana endocannabinoide de la enfermedad de Huntington. Aunque mucho menos abundante en el estriado que el receptor CB₁, se ha reportado su sobreexpresión en paralelo a los acontecimientos degenerativos de la enfermedad, tanto en cerebros *post mortem* de pacientes como en modelos animales (Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009). La activación del receptor CB₂ en modelos animales de la enfermedad ejerce efectos beneficiosos debido a su acción anti-inflamatoria, relacionada principalmente con la acción de las células microgliales reactivas reclutadas en los lugares de lesión (Palazuelos et al., 2009).

La señalización cannabinoide también se ha visto comprometida en modelos animales de otras enfermedades neurodegenerativas: se ha observado un aumento en los niveles de endocannabinoides en GP asociados a una reducción del movimiento en modelos animales de Parkinson así como el restablecimiento de los niveles tras el tratamiento con levodopa (Di Marzo et al., 2000; Maccarrone et al., 2003; van der Stelt et al., 2005), un aumento de los niveles del receptor CB₂ en microglía colindante a las placas seniles en pacientes de Alzheimer (Ramírez et al., 2005; Solas et al., 2013) y un aumento de los componentes del sistema a nivel de médula espinal en modelos de esclerosis múltiple, donde juegan un papel en la reducción de la sintomatología espástica además de cómo neuroprotectores, ralentizando la progresión de la enfermedad (Baker et al., 2001; Pryce and Baker, 2015). La naturaleza progresiva de la mayoría de estas enfermedades acaba provocando la sobre-activación del sistema endocannabinoide de manera permanente, dejando a un lado el papel neuroprotector para contribuir a los síntomas, como por ejemplo la inhibición motora y la pérdida de memoria típica de Parkinson y Alzheimer respectivamente, que pueden ser contrarrestadas con antagonistas del receptor CB₁ (Di Marzo et al., 2000; Mazzola et al., 2003; More and Choi, 2015).

1.7.5. Receptores de adenosina

La adenosina es un nucleósido endógeno formado por la base purínica adenina unida a un anillo de ribosa. Es un importante intermediario metabólico esencial para la formación de los ácidos nucleicos y componente clave de la principal molécula energética, el ATP. Además, como molécula de señalización a través de la activación de sus receptores, está implicada en múltiples funciones biológicas, principalmente en tejidos excitables como el corazón y el cerebro (Jacobson and Gao, 2006). De hecho es uno de los medicamentos anti-arrítmicos más frecuentes en la práctica clínica y un potente vasodilatador arterial. También está implicado en el balance energético, ya que inhibe la lipólisis y aumenta la captación y oxidación de la glucosa (Johansson et al., 2007), en la neuroprotección en procesos de hipoxia/isquemia (Eltzschig and Eckle, 2011), con un papel anti-inflamatorio a nivel de función inmune (Rosenberger et al., 2009) y en la regulación de la función respiratoria y el sueño (Lazarus et al., 2011), entre otros.

La adenosina proviene de la hidrólisis de nucleótidos extracelulares de adenina mediada por nucleosidasas y de la liberación a través de un transportador que mantiene las concentraciones intra- y extracelulares en equilibrio o como resultado de daño celular (Jacobson and Gao, 2006). La adenosina liberada es rápidamente metabolizada por la enzima adenosina quinasa y, en menor medida, por la enzima adenosina deaminasa a AMP y inosina, siendo ambos productos menos activos que la adenosina sobre sus receptores (Jacobson and Gao, 2006).

Como se ha comentado, la adenosina lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con cuatro subtipos diferentes de receptores tipo GPCR, clasificados en función de sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Sebastião and Ribeiro, 2009). Filogenéticamente están relacionados con los receptores de aminas biogénicas y, en humanos, la similitud de secuencia es baja, siendo de tan solo un 49% entre los receptores A_1 y A_3 y de un 59% entre A_{2A} y A_{2B} (Jacobson and Gao, 2006). Mientras que los subtipos A_1 y A_{2A} son receptores de alta afinidad (K_i de 73 nM y 150 nM respectivamente) a través de los cuáles la adenosina lleva a cabo principalmente su función neuromoduladora, los receptores A_3 y A_{2B} son de baja afinidad (K_i de 5100 nM y 6500 nM, respectivamente), siendo relevante su activación en condiciones en que la concentración de adenosina aumenta de manera significativa (Yan et al., 2003).

Clásicamente, la activación de los receptores de adenosina ocurre a través de la estimulación o inhibición de la enzima AC, aunque también aparecen relevantes las vías de señalización dependientes de PLC, Ca^{2+} y MAPKs. El receptor A_1 se acopla a proteína $G_{i/o}$, inhibiendo la enzima AC y activando a PLC, conllevando el aumento en los niveles de DAG, IP3 y Ca^{2+} intracelulares (Cronstein and Sitkovsky, 2017). Además, su activación puede activar canales de K^+ sensibles a toxina pertussis y canales de K^+ sensibles a ATP a la vez que puede inhibir canales de Ca^{2+} tipo Q, P y N (Fredholm et al., 2011). La activación del receptor A_3 también inhibe la enzima AC mediante su acoplamiento a proteína $G_{i/o}$ (Zhou et al., 1992), aunque también se ha descrito su acoplamiento a proteína G_q , a través del cual activa a PLC e incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelulares (Abbracchio et al., 1995). Por su parte, los receptores A_{2A} y A_{2B} se acoplan a proteína G_s , activando la enzima AC, estimulando la formación de cAMP y estimulando la proteína PKA, que regula por fosforilación a diversos substratos intracelulares (Cronstein and Sitkovsky, 2017). El receptor A_{2A} puede acoplarse también a proteína $G_{o1\beta}$, similar a G_s y también acoplada a AC

1. Introducción

(Kull et al., 2000), y el receptor A_{2B} a proteína G_q , activando a PLC e induciendo el consecuente aumento de DAG, IP3 y Ca^{2+} intracelular (Linden et al., 1999) (Figura 29).

La adenosina es el agonista endógeno y la base estructural de todos los agonistas conocidos, normalmente modificados en la posición 2 y 6 del anillo de adenina o en la posición 5' de la ribosa (Choi et al., 2009). La misma aproximación permitió el descubrimiento de los antagonistas de los receptores de adenosina, fruto de la modificación de metilxantinas tales como la cafeína o la teofilina (Moro et al., 2006).

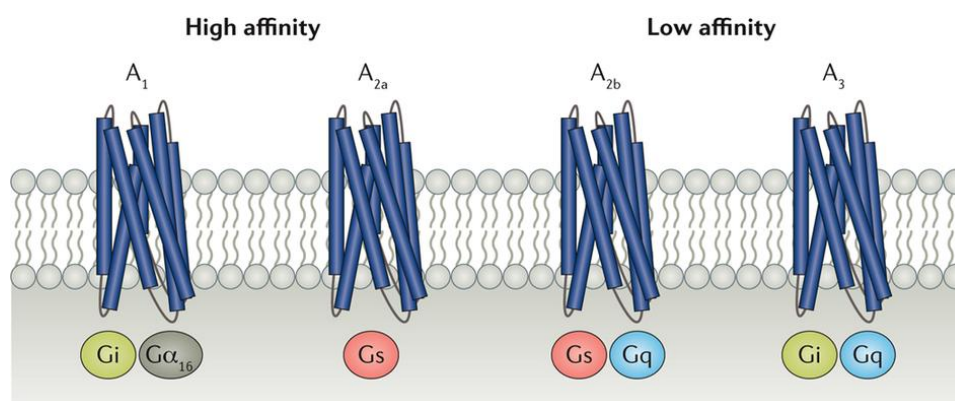


Figure 29. Los receptores de adenosina son GPCRs cuya transducción de señal es mediada por activación de proteínas G intracelulares. (Extraído de Cronstein y Sitkovsky 2017).

A nivel de SNC, la adenosina es secretada por la mayoría de células, incluyendo neuronas y glia, y tiene un importante papel como neuromodulador tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Los dos subtipos principales de receptores de adenosina en el cerebro son los receptores de alta afinidad A_1 y A_{2A} , que se expresan tanto de forma pre-sináptica como post-sináptica (Jacobson and Gao, 2006). El receptor A_1 está ampliamente distribuido en el SNC, principalmente en neuronas de la corteza, hipocampo y cerebelo y en células gliales, mientras el receptor A_{2A} presenta una localización más restringida, especialmente en el estriado y el bulbo olfatorio (Fredholm et al., 2011).

La adenosina comparte muchas propiedades con el neurotransmisor GABA, siendo ambas las principales moléculas en el control de la transmisión sináptica glutamatérgica en el SNC. La adenosina en el estriado actúa como señal intrínseca ya que se produce localmente en función de la actividad de los circuitos estriatales. Aquí, el receptor de adenosina A_{2A} co-localiza con encefalina y receptores D_2 de dopamina pero no con receptores D_1 , sustancia P o somatostatina, indicando una expresión preferencial en las MSNs de la vía indirecta (Schiffmann et al., 2007), donde puede interactuar con receptores D_2 para modular los efectos tanto del glutamato como de la dopamina. De hecho, ambos receptores pueden formar heterómeros y el balance de su mutua modulación contribuye a la determinación de la respuesta neuronal (Ferré et al., 2008). Diversos estudios muestran que el bloqueo de los receptores A_{2A} post-sinápticos induce efectos motores activadores, consistentes con la inactivación de la vía indirecta (Orrú et al., 2011; Tebano et al., 2012). El receptor A_{2A} se expresa también y de manera importante a nivel pre-sináptico, en las neuronas glutamatérgicas que contactan con las MSNs de la vía directa (Quiroz et al., 2009); aquí puede formar heterómeros con el receptor de adenosina A_1 (Ciruela et al., 2006). En el heterómero A_1 - A_{2A} , la activación del receptor A_{2A} reduce la afinidad de los agonistas por el receptor A_1 , proveyendo un mecanismo por el cual bajas concentraciones de adenosina

pueden inhibir la liberación de glutamato mientras altas concentraciones pueden estimular dicha liberación (Ciruela et al., 2006).

1.7.6. Neuroprotección mediada por los receptores A_{2A} y CB_1

Además del glutamato, otros sistemas de neurotransmisión controlan la actividad de las sinapsis cortico-estriatales. El estriado recibe *inputs* excitadores glutamatérgicos de la corteza y el tálamo y dopaminérgicos del VTA y la SN, representando sus fibras la mayor fuente de dopamina hacia el estriado, la cual puede regular la liberación de forma directa a través de la estimulación de receptores D_2 localizados en las aferencias de la corteza (Bamford et al., 2004). Los receptores de adenosina A_{2A} y los receptores de cannabinoides CB_1 son particularmente abundantes en estos terminales y juegan un papel importante en la liberación de glutamato.

Diversos estudios muestran una disminución tanto del receptor A_{2A} como de su transcripción incluso antes de detectarse los primeros síntomas motores en pacientes de la enfermedad de Huntington (Glass et al., 2000; Villar-Menéndez et al., 2013). Varani y colaboradores también reportaron una disminución del mRNA del receptor A_{2A} en células de estriado que expresan la proteína huntingtina mutada, acompañada, sin embargo, de una densidad normal del receptor y de una amplificación aberrante de la actividad de la enzima AC inducida por la estimulación del receptor, explicable debido a la pérdida de la función protectora de la huntingtina WT (Varani et al., 2001); de la misma manera, en ratones R6/2 (ratones transgénicos que presentan el promotor de la huntingtina humana y el exón 1 del gen *HD* codificando para 144 repeticiones del triplete CAG), se observó un aumento significativo en la densidad de receptores y de la actividad de la enzima AC, contribuyendo probablemente a la excitotoxicidad (Tarditi et al., 2006). Si consideramos que las discrepancias entre la expresión de receptores y el aumento en la densidad y la señalización sugieren mecanismos compensatorios causados por la enfermedad, el receptor pre-sináptico A_{2A} emerge como una posible diana en el tratamiento de la enfermedad de Huntington, debido a los efectos neuroprotectores derivados del antagonismo de estos receptores (Blum et al., 2003). De hecho, el bloqueo de los receptores A_{2A} pre-sinápticos contrarresta la liberación de glutamato y el *output* motor inducido por la estimulación cortical (Orrú et al., 2011; Quiroz et al., 2009; Tebano et al., 2012). En este contexto, cabe destacar que la afinidad de los antagonistas de A_{2A} dependía de la heteromerización de dicho receptor con otros receptores (Orru et al., 2011), así como el hecho que el receptor A_{2A} también se expresa en neuronas GABAérgicas estriato-palidales y su activación muestra efectos beneficiosos en modelos genéticos de la enfermedad (Lee and Chern, 2014).

Tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico también se expresan receptores CB_1 . Como se ha comentado anteriormente, los cannabinoides inhiben la transmisión glutamatérgica al actuar a través de receptores CB_1 cuya activación incrementa la liberación de BDNF desde los terminales pre-sinápticos (Marsicano et al., 2003), contribuyendo a la neuroprotección. En modelos animales de la enfermedad se observa una reducción de la expresión de receptores CB_1 así como de los niveles de endocannabinoides (Bisogno et al., 2008; Scotter et al., 2010) y se ha demostrado que esta disminución en la expresión se da en las terminales GABAérgicas pero no en las glutamatérgicas (Chiodi et al., 2012).

Los datos obtenidos hasta el momento muestran que la disfunción de las MSNs de la vía indirecta y la pérdida de expresión tanto del receptor A_{2A} como del receptor CB_1 podrían

preceder a la muerte celular en el estriado, representando una interesante diana en terapias neuroprotectoras.

1.8. Cannabinoides en cáncer

Los efectos paliativos de los cannabinoides en pacientes de cáncer están bien establecidos, siendo su principal uso como anti-emético (Guzmán, 2003a; Pertwee, 2009). De hecho, dos de los tres medicamentos basados en cannabinoides y comercializados hoy son el Marinol® (dronabinol, THC sintético) y el Cesamet® (nabilona, análogo sintético del THC) y se prescriben para prevenir las náuseas y los vómitos inducidos por los protocolos de quimioterapia estándar. Los efectos anti-eméticos de los cannabinoides representan una gran ayuda terapéutica sobre todo en aquellos pacientes en que los efectos anti-eméticos de los opioides son poco tolerados. El tercer fármaco, el Sativex®, inicialmente prescrito para aliviar la espasticidad asociada a la esclerosis múltiple, actualmente se prescribe en Canadá para tratar el dolor asociado al cáncer.

El potencial terapéutico de los cannabinoides en oncología no se restringe tan solo a sus bien establecidos efectos paliativos. Desde finales de la década de 1990 múltiples datos ponen de manifiesto los efectos anti-tumorales de estos compuestos en diferentes modelos de cáncer (Guzmán, 2003b; Jones and Howl, 2003; Sarfaraz et al., 2008), aunque también hay estudios que evidencian que en ciertas condiciones el tratamiento con cannabinoides puede tener efectos oncogénicos. La controversia sobre el papel oncogénico o supresor tumoral del sistema endocannabinoide puede explicarse en parte debido al comportamiento bifásico del sistema y a la resistencia a las acciones promotoras de muerte celular inducidas por Δ^9 -THC en ciertos tipos de cáncer, entre otras.

En todo caso, la gran mayoría de datos experimentales acumulados durante los últimos años que muestran la capacidad anti-tumoral de los cannabinoides describen su acción en el bloqueo de diversos puntos clave de la progresión tumoral, teniendo en cuenta la capacidad moduladora de estos compuestos sobre las vías de señalización clave en el control del destino celular. Los efectos más prevalentes son la inducción de la muerte celular por apoptosis y la inhibición de la proliferación celular, además de la interferencia con la angiogénesis y la inducción del bloqueo de la capacidad invasora y la metástasis. Estos efectos, además, se han observado en casi todos los tipos de tumores estudiados, desde gliomas a melanomas pasando por carcinomas de piel, mama, pulmones, páncreas y linfomas, entre otros, mostrando una acción no específica de la naturaleza del tumor (Velasco et al., 2012) aunque sí dependiente del estado proliferativo o de diferenciación de las células diana. Ya en 1998, De Petrocellis y colaboradores reportaron que la anandamida ejercía su acción anti-proliferativa a través de un mecanismo de inhibición dependiente de CB_1 (De Petrocellis et al., 1998). En la misma línea, la supresión selectiva de los receptores CB_1 acelera el crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de colon en ratón (Izzo et al., 2008) y la estimulación de los receptores CB_1 y CB_2 causa el bloqueo de la proliferación de las células cancerosas o la inducción de su apoptosis *in vitro* (Galve-Roperh et al., 2000; Ligresti et al., 2003), y la inhibición del crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis *in vivo*. En ratones *nude* (atímicos desnudos), la administración de cannabinoides frena el crecimiento de varios tipos de tumores heterólogos incluyendo carcinoma de pulmón (Munson et al., 1975), glioma (Galve-Roperh et al., 2000), epiteloma de tiroide (Bifulco et al., 2001), linfoma (McKallip et al., 2002) y carcinoma de piel (Casanova et al., 2003). Otros estudios también a partir de tumores heterólogos, en este caso por inyección subcutánea de

células de glioma también en ratones atímicos, muestran que la administración local de Δ^9 -THC, CBD, del agonista de los receptores CB_1 y CB_2 WIN55212 o del agonista selectivo de los receptores CB_2 JWH-133, provoca una disminución del crecimiento tumoral (Galve-Roperh et al., 2000; Massi et al., 2004; Sánchez et al., 2001), y en el caso del JWH-133 también de las células tumorales procedentes de pacientes con glioblastoma multiforme (Sánchez et al., 2001). Otros componentes del sistema endocannabinoide también han sido relacionados con comportamientos anti-cancerígenos. Así, una reducción en los niveles de las enzimas encargadas de la degradación de los cannabinoides induce un menor crecimiento tumoral en ratones con un trasplante heterólogo o xenotrasplante, mientras un aumento en los niveles de cannabinoides tendría un papel protector, anti-tumoral (Malfitano et al., 2011; Velasco et al., 2016). Además, se ha observado una fuerte relación entre el nivel de componentes del sistema endocannabinoide y la agresividad tumoral. Así, se ha descrito por ejemplo una sobre-regulación de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) en tumores humanos de gran agresividad y en líneas de células cancerosas (Nomura et al., 2010).

El mecanismo de acción anti-tumoral de los cannabinoides se estudió inicialmente a partir de la administración de Δ^9 -THC. Se descubrió que este compuesto es capaz de inducir la muerte por apoptosis de las células de un glioma a través de la estimulación de la síntesis de ceramida, un esfingolípido pro-apoptótico, e induciendo a su vez el arresto del ciclo celular (Figura 30). Esta acción es dependiente de los receptores CB_1 y CB_2 (Blázquez et al., 2004; Cianchi et al., 2008; Galve-Roperh et al., 2000; Gómez del Pulgar et al., 2002; Sánchez et al., 2001). El Δ^9 -THC también se ha relacionado con la estimulación de la autofagia mediante la regulación positiva que éste ejerce sobre la proteína *stress-regulated protein p8* (Salazar et al., 2009), implicada también en la apoptosis mediada por ceramida (Encinar et al., 2001). La inhibición farmacológica o genética del proceso autofágico previene la acción anti-tumoral de los cannabinoides en diferentes modelos animales de cáncer, lo cual demuestra que dicho fenómeno resulta clave en la actividad antineoplásica de estos compuestos (Salazar et al., 2009; Vara et al., 2011). Además de la acumulación de ceramida, en células de glioma se ha descrito un nuevo mecanismo: la inducción de la apoptosis vía inhibición de Akt, dependiente de la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), un tipo de respuesta al estrés relacionada con el RE. Esta respuesta depende de una vía de señalización compleja que se activa por depleción de Ca^{2+} , daño oxidativo o ciertos agentes anti-cancerígenos, entre otros (Schröder and Kaufman, 2005) y en última instancia puede inducir muerte celular por apoptosis. Algunos estudios también han reportado la habilidad de los cannabinoides de interferir en la activación de receptores para factores de crecimiento (Guzmán, 2003b; Sarfaraz et al., 2008), que estarían mediando su acción citotóxica en diferentes tipos de cáncer.

También hay estudios que describen el papel oncogénico de los cannabinoides. Así, el Δ^9 -THC puede estimular el crecimiento tumoral *in vitro* al acelerar la proliferación en vez de inducir apoptosis (Cudaback et al., 2010; Hart et al., 2004). Además, se conoce la modulación que ejercen los cannabinoides sobre la expresión de quimioquinas y citoquinas, jugando un importante papel en inflamación. En esta línea, el Δ^9 -THC vía receptor CB_2 suprime la respuesta inmune anti-tumoral aumentando el crecimiento tumoral en cáncer de mama (McKallip et al., 2005). Como se ha comentado anteriormente, evidencias experimentales muestran que los cannabinoides tienen un papel neuroprotector frente a la apoptosis inducida por excitotoxicidad, isquemia o daño oxidativo. Es evidente, pues, que los cannabinoides regulan las vías de supervivencia y muerte celular de manera diferente en células tumorales y en células no tumorales.

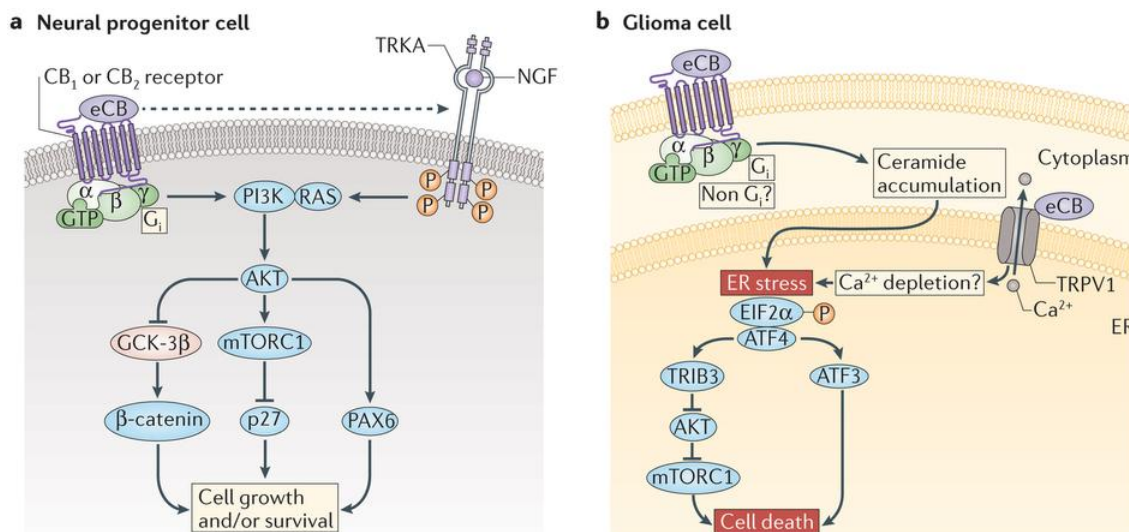


Figura 30. Señalización normal (a) y desregulación de la señalización mediada por receptores cannabinoides en células de glioma (b). (Extraído de Maccarrone et al., 2014)

Los datos acumulados hasta el momento indican cierta selectividad en la acción de los cannabinoides sobre células cancerígenas así como la implicación diferencial de los receptores CB₁ y CB₂ dependiendo del tipo de tumor. Así, el bloqueo tanto de receptores CB₁ como CB₂ previenen la muerte celular inducida por cannabinoides en células de glioma con una eficacia similar entre sí (Galve-Roperh et al., 2000; Lorente et al., 2011). En contraposición, en cáncer de páncreas (Carracedo et al., 2006), hígado (Vara et al., 2011) o mama (Caffarel et al., 2006) entre otros, los antagonistas de los receptores CB₂ inhiben la acción anti-tumoral de los cannabinoides, no así los antagonistas de los receptores CB₁. Otros estudios también muestran esta selectividad, de manera que la estimulación farmacológica de receptores CB₂ puede inducir la apoptosis de diferentes células inmunes, fenómeno que se relaciona con los efectos inmuno-supresores descritos para los cannabinoides (Lombard et al., 2007; Rieder et al., 2010).

1.8.1. Cáncer de mama; implicación de GPR55

Cada vez son más las evidencias que apoyan el papel del receptor GPR55 en el circuito molecular que controla el comportamiento de las células cancerígenas. De hecho, se ha descrito su implicación directa en la proliferación celular *in vivo* e *in vitro* en modelos de glioblastoma (Andradas et al., 2011), próstata y ovario (Piñeiro et al., 2011), carcinoma de piel (Pérez-Gómez et al., 2013), melanoma cutáneo (Adinolfi et al., 2013) y cáncer de pulmón no microcítico (He et al., 2015) y su asociación indirecta con respuestas pro-angiogénicas (Hofmann et al., 2015) y pro-migratorias en cáncer de mama (Ford et al., 2010) y cáncer de colon (Kargl et al., 2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en la actualidad el cáncer de mama es el de mayor incidencia en mujeres en todo el mundo. Aunque la tasa de mortalidad asociada ha ido disminuyendo desde finales de la década de los 90 gracias a los programas de detección y prevención y a la terapia combinada, ciertos tipos de cáncer de mama son resistentes a las terapias convencionales, poniendo de manifiesto la necesidad de desarrollar

nuevas estrategias. El cáncer de mama es una enfermedad extremadamente heterogénea que comprende tumores muy diversos teniendo en cuenta su perfil de expresión génica y molecular, su pronóstico y el tipo de tratamiento (Higgins and Baselga, 2011). En función de los perfiles moleculares clásicos se distinguen tres subtipos de cáncer de mama: positivos para receptores de estrógenos (ER) y receptores de progesterona (PG), que incluyen los subtipos luminal A o de progresión lenta y luminal B o de progresión rápida, positivos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2) y basales o triple negativos (negativos para receptores ER, receptores PG y receptores HER-2).

Diversos estudios muestran el papel modulador de los cannabinoides en el subtipo de cáncer de mama positivo para receptores hormonales. En las líneas celulares MCF-7 y EFM-19 usadas como modelo, la anandamida vía receptores CB₁ es capaz de frenar la proliferación al bloquear la progresión en el ciclo celular evitando la transición de la fase G1 a la fase S. Además, la inhibición de la enzima AC y la activación de la vía de las MAPK comporta, en última instancia, la regulación negativa de la prolactina y el factor de crecimiento nervioso NGF, inductores de la proliferación (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 2000). Se ha reportado también el efecto inhibitor de los cannabinoides sobre la migración e invasión celular en células MCF-7 en cultivo, vía activación de los receptores CB₂ (Nasser et al., 2011). Por otra parte, en modelos de cáncer de mama HER-2 positivos, el Δ^9 -THC es capaz de reducir la proliferación al inhibir la quinasa Akt, inducir la muerte celular por apoptosis y reducir la angiogénesis en ratones MMTV-neu (Caffarel et al., 2010), un modelo clínicamente relevante para tumores HER-2 positivos metastáticos (Ursini-Siegel et al., 2007). Estos efectos dependientes de Δ^9 -THC son mimetizados por la administración del agonista selectivo de receptores CB₂ JWH-133 (Caffarel et al., 2010). Por lo que respecta al subtipo triple negativo, también hay evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de los efectos anti-proliferativos de ciertos cannabinoides sintéticos. Como ejemplo, el análogo estable de la anandamida Met-F-AEA reduce la proliferación al inducir el arresto del ciclo celular (Laezza et al., 2006) y el agonista selectivo de los receptores CB₂ JWH-133 ralentiza e inhibe la proliferación *in vivo* en tumores heterólogos como en el modelo de ratón transgénico *polyoma middle T oncoprotein* (PyMT) (Qamri et al., 2009).

Como se ha comentado anteriormente, además de los efectos anti-tumorales de los cannabinoides, algunos estudios han reportado acciones pro-oncogénicas en diversos tipos de cáncer. Por lo que respecta al cáncer de mama, Takeda y colaboradores reportaron el efecto proliferativo del Δ^9 -THC en células MCF-7 en cultivo (Takeda et al., 2008), modelo de cáncer de mama positivo en receptores hormonales con una baja o nula expresión de receptores tipo CB₁ y CB₂ (McKallip et al., 2005).

Ford y colaboradores mostraron por primera vez la expresión de GPR55 en células de cáncer de mama, siendo su expresión treinta veces mayor en modelos celulares triple negativos y de gran poder metastático que en modelos de cáncer positivo para receptores hormonales y de bajo poder metastático, sugiriendo una posible relación entre los altos niveles del receptor y el potencial metastático de los carcinomas de mama (Ford et al., 2010). Además, el mismo estudio mostró que la administración de LPI aumentaba de manera significativa la migración celular vía GPR55. También se ha reportado la expresión de GPR55 en tumores de mama humanos, encontrándose niveles más elevados en aquellos con peor pronóstico (Andradas et al., 2011; Leyva-Illades and Demorrow, 2013). La sobre-expresión de GPR55 conlleva una mayor viabilidad celular y un aumento en la fosforilación de ERK, sugiriendo que los efectos proliferativos del receptor son el resultado de la activación de ERK y la consecuente expresión del gen temprano Fos, proto-oncogen relevante en el crecimiento celular (Andradas et al., 2011; Hazzalin and Mahadevan, 2002).



2. OBJETIVOS

El concepto de que los receptores de la misma o diferentes familias se pueden combinar entre sí para generar una nueva unidad con características bioquímicas y funcionales únicas, está hoy en día plenamente aceptado y constituye un área emergente en el campo de la señalización mediada por GPCRs. De hecho, se ha demostrado que la farmacología y los parámetros de transducción de señales de los heterómeros de GPCRs son diferentes a los de cada uno de los protómeros que constituye el complejo. Los heterómeros de receptores se consideran, pues, nuevas dianas farmacológicas teniendo en cuenta su posible especificidad de localización y sus características bioquímicas únicas, entre ellas las modulaciones alostéricas. El alosterismo puede ser debido a varias circunstancias entre las que destacan interacciones entre los protómeros del complejo y entre éstos y las proteínas G. Las consecuencias a nivel farmacológico y funcional son un reconocimiento diferencial de ligandos y la modulación del tráfico intracelular y del acoplamiento a proteínas G. En este contexto, uno de los principales retos deriva de la gran variedad de procesos que se ven modulados por la estimulación de un mismo GPCR dependiendo de su localización o interacción con otros receptores o proteínas. El sistema orexinérgico es un buen ejemplo de sistema implicado en un amplio abanico de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, desde el control de la ingesta y la regulación de los estados de sueño/vigilia a la regulación neuroendocrina y la participación en los mecanismos moleculares de adicción a drogas. Las acciones de las orexinas están mediadas por dos GPCRs y es el receptor OX_1 el que se asocia principalmente con los procesos de recompensa, tanto a reforzadores naturales como la alimentación como en el caso de drogas de abuso. La oligomerización de GPCRs constituye un proceso de regulación de orden superior poco explorado en el caso del receptor OX_1 , pero que se sugiere de gran relevancia para explicar los efectos moduladores de las orexinas. Teniendo en cuenta el importante papel de las hormonas leptina y grelina en el control de la ingesta así como la implicación cabal del factor CRF y la respuesta al estrés en la recaída al consumo de drogas de abuso, los dos primeros objetivos de esta Tesis fueron:

1. Investigar la formación de heterómeros entre los receptores de orexina OX_1 , leptina LEP y grelina GHS-R1a y realizar su caracterización funcional

2. Investigar la formación de heterómeros entre los receptores OX_1 y CFR_2 y realizar su caracterización funcional en un contexto de adicción a anfetamina

El sistema cannabinoide desempeña, asimismo, un marcado papel modulador en múltiples procesos fisiológicos y su desregulación se asocia con alteraciones patológicas, desde enfermedades neurodegenerativas a alteraciones en el control central de la ingesta, con procesos de inflamación y con desórdenes cardiovasculares y cáncer. La actividad neuroprotectora de los cannabinoides se ha descrito tanto *in vivo* como *in vitro* y hoy en día se investiga su gran potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. Concretamente en la enfermedad de Huntington se ha descrito una pérdida notable de receptores CB_1 en los ganglios basales tanto de modelos animales como de pacientes, sugiriendo un posible papel terapéutico de los cannabinoides en estadios avanzados de la enfermedad. La oligomerización de receptores CB_1 ha sido ampliamente estudiada; así, se ha descrito la capacidad de heteromerizar de los receptores CB_1 y A_{2A} , receptor este último involucrado en los efectos neuroprotectores de la adenosina en el SNC y que también presenta una

2. Objetivos

disminución en estadios avanzados de la enfermedad de Huntington. Teniendo en cuenta estos precedentes, el tercer objetivo de esta Tesis fue:

3. Caracterizar el perfil anatómico y de señalización del heterómero de receptores A_{2A} y CB_1 en el estriado dorsal e investigar si se ve afectado en la enfermedad de Huntington

La habilidad protectora de los cannabinoides no se limita a los desórdenes neurodegenerativos sino también a los procesos oncogénicos. El potencial terapéutico de los cannabinoides en oncología se ha estudiado principalmente por sus efectos paliativos a nivel de inhibición de la emesis y alivio del dolor, pero son múltiples las evidencias que ponen de manifiesto los efectos anti-tumorales de estos compuestos en diferentes modelos de cáncer. El receptor cannabinoide CB_2 y el receptor huérfano GPR55, capaz de responder a diversos compuestos cannabinoides, se encuentran sobre-expresados en diversos tipos de tumores humanos y se ha descrito su implicación en el control del destino de las células tumorales. Aunque poco explorada a nivel de ambos receptores, la oligomerización se presenta como un mecanismo de regulación superior capaz de explicar el comportamiento bimodal de la actividad cannabinoide observada en la regulación de distintos procesos y dependiente de la dosis. Con estos datos, el cuarto y último objetivo de esta Tesis fue:

4. Investigar la formación de heterómeros entre los receptores CB_2 y GPR55 en células cancerígenas y determinar el papel del complejo en la señalización cannabinoide en tumores



3. RESULTADOS



Informe aportado por los directores de la tesis doctoral presentada en el formato de compendio de publicaciones.

Josefa Mallol Montero y Vicent Casadó Burillo del Grupo de Neurobiología Molecular del Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (Diagonal, 643, Edifici Prevosti, planta -2; 08028-Barcelona), directores de la tesis doctoral "Implicación estructural y funcional de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G de relevancia en adicción, enfermedad de Huntington y cáncer" presentada por Mireia Medrano Moya en el formato de compendio de publicaciones, emiten el siguiente informe normativo:

El manuscrito "**Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons**" ha sido enviado a *Molecular Neurobiology*, revista con un índice de impacto de 5,4. El manuscrito "**Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, orexin receptor OX₁ and CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex**" está preparado para ser enviado a *Neuropharmacology*, revista con un índice de impacto de 4,9. El artículo "**Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} - cannabinoid CB₁ receptor heteromers in the dorsal striatum**" ha sido publicado en *Neuropsychopharmacology*, revista con un índice de impacto de 6,4. El artículo "**Targeting CB₂-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling**" ha sido publicado en *The Journal of Biological Chemistry*, revista con un índice de impacto de 4,6.

En el trabajo "**Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons**", la doctoranda Mireia Medrano Moya ha realizado la totalidad de la parte experimental exceptuando la preparación de los cultivos primarios utilizados en los experimentos que se muestran en la figura 5.

En el manuscrito "**Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, orexin receptor OX₁ and CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex**" la doctoranda Mireia Medrano Moya, en co-autoría con la Dra. Gemma Navarro, ha realizado la totalidad de la parte experimental, exceptuando las determinaciones de cAMP y BRET en las que colaboró David Aguinaga y los experimentos de microdiálisis realizados por la doctoranda, conjuntamente con Ignacio Vega-Quiroga, durante su estancia en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Adicción en la Facultat de Ciències Biològiques de la Pontificia Universidad Católica de Chile, bajo la dirección de la Dra. Katia Gysling.

En el trabajo "**Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} - cannabinoid CB₁ receptor heteromers in the dorsal striatum**", la doctoranda Mireia Medrano Moya ha realizado los experimentos de señalización por determinación de los niveles de cAMP, de Ca²⁺ intracelular y de redistribución dinámica de masa celular (DMR) en células, conjuntamente con la Dra. Estefanía Moreno Guillén.

En el artículo "**Targeting CB₂-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling**", la doctoranda Mireia Medrano Moya consta como primer autor, en co-autoría con la Dra. Estefanía Moreno y la Dra. Clara Andradás. Exceptuando la evaluación del tamaño de los tumores y la fosforilación de ERKS mostradas en la figura 8 (apartados C y D), la doctoranda ha realizado la totalidad de la parte experimental conjuntamente con la Dra. Estefanía Moreno Guillén.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Para la elaboración de su tesis doctoral la Dra. Anna Chiarlone ha utilizado resultados contenidos en el artículo **“Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} -cannabinoid CB_1 receptor heteromers in the dorsal striatum”** con anterioridad a la publicación del mismo.

La Dra. Clara Andradas ha utilizado algunos resultados contenidos en el artículo **“Targeting CB_2 -GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling”** en la elaboración de su tesis doctoral, antes de la publicación del citado artículo.

Finalmente, Sandra Blasco-Benito está en fase de escritura de su tesis doctoral y, eventualmente, utilizará el artículo **“Targeting CB_2 -GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling”**.

Barcelona, a 30 de Marzo de 2017

Dra. Josefa Mallol Montero

Dr. Vicent Casadó Burillo

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

3.1. Mireia Medrano, David Aguinaga, Irene Reyes, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Gemma Navarro*, Rafael Franco*. ***Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons.***

Manuscrito enviado a *Molecular Neurobiology*

3.2. Gemma Navarro*, **Mireia Medrano***, David Aguinaga, Ignacio Vega-Quiroga, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Katia Gysling, Rafael Franco. ***Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, orexin receptor OX₁ and CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex.***

Manuscrito en preparación para ser enviado a *Neuropharmacology*

3.3. Estefanía Moreno, Anna Chiarlone, **Mireia Medrano**, Mar Puigdemívol, Lucka Bibic, Lesley A. Howell, Eva Resel, Nagore Puente, María J. Casarejos, Juan Perucho, Joaquín Botta, Núria Suelves, Francisco Ciruela, Silvia Ginés, Ismael Galve-Roperh, Vicent Casadó, Pedro Grandes, Beat Lutz, Krisztina Monory, Enric I. Canela, Carmen Lluís*, Peter J. McCormick*, Manuel Guzmán*. ***Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} - cannabinoid CB₁ receptor heteromers in the dorsal striatum.***

Artículo publicado en *Neuropsychopharmacology*. 2017 Feb 15. doi: 10.1038/npp.2017.12. [Epub ahead of print]

3.4. Estefanía Moreno*, Clara Andradas*, **Mireia Medrano***, María M. Caffarel, Eduardo Pérez-Gómez, Sandra Blasco-Benito, María Gómez-Cañas, M. Ruth Pazos, Andrew J. Irving, Carmen Lluís, Enric I. Canela, Javier Fernández.Ruiz, Manuel Guzmán, Peter J. McCormick*, Cristina Sánchez*. ***Targeting CB₂-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling.***

Artículo publicado en *The Journal of Biological Chemistry*. 2014 Aug 8;289(32):21960-72.

3.1. *Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons.*

Mireia Medrano, David Aguinaga, Irene Reyes, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Gemma Navarro*, Rafael Franco*.

Manuscrito enviado a *Molecular Neurobiology*

El hipotálamo es el centro clave para la integración de la información nutricional originada en la periferia y mediada a través de hormonas y metabolitos circulantes, además de vías neurales procedentes principalmente del tronco encefálico. Las neuronas que contienen neuropéptido Y (NPY) localizadas en el núcleo arcuato hipotalámico (ARC) son claves en la regulación de la ingesta, al integrar las señales procedentes del tronco encefálico y la periferia. Las neuronas diana para las orexinas en el núcleo ARC se superponen ampliamente con las dianas de la grelina y la leptina, de manera que las neuronas que contienen NPY son reguladas de manera directa y cooperativa tanto por grelina y orexina como por leptina. Las interacciones a nivel de péptidos han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, los fundamentos moleculares siguen siendo desconocidos. En este trabajo (1) mostramos que los receptores de grelina GHS-R1a, de leptina LEP y de orexinas OX₁ pueden establecer interacciones físicas directas en un sistema de expresión heteróloga, (2) que los complejos heterodiméricos y heterotriméricos poseen propiedades de señalización únicas y (3) obtenemos evidencias convergentes de la expresión del heterotrímero de receptores en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas. En conjunto, nuestros resultados constituyen un avance significativo en el conocimiento de las bases moleculares que subyacen a la integración de señales orexinérgicas y anorexinérgicas centrales y periféricas en el ARC hipotalámico.

OREXIN A MODULATES LEPTIN RECEPTOR-MEDIATED SIGNALING BY AN ALLOSTERIC MODULATION MEDIATED BY THE GHRELIN GHS-R1A RECEPTOR IN HYPOTHALAMIC NEURONS

Mireia Medrano^{1,2}, David Aguinaga^{1,2}, Irene Reyes-Resina^{1,2}, Enric I. Canela^{1,2}, Josefa Mallol^{1,2}, Gemma Navarro^{*2,3} and Rafael Franco^{*1,2}

Affiliations:

1. Molecular Neurobiology laboratory. Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine. University of Barcelona. Spain.
2. Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.
3. Department of Biochemistry and Physiology. Pharmacy School. University of Barcelona. Spain.

* Equal contribution

Corresponding authors:

Gemma Navarro
g.navarro@ub.edu dimartts@ub.edu
34 934021218

Rafael Franco
rfranco123@gmail.com rfranco@ub.edu
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Diagonal 643. Prevoiti Building. 08028 Barcelona. Spain.
+34 934021208

SUMMARY

The hypothalamus is a key integrator of nutrient-induced signals in the form of hormones and metabolites originated in both the central nervous system and the periphery. The main autocrine and paracrine target of orexinergic-related hormones such as leptin, orexin and ghrelin are neuropeptide Y neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus. The aim of this study was to investigate the expression and the molecular and functional relationships between leptin, orexin and ghrelin receptors. Biophysical studies in an heterologous system showed the physical interactions between them with potential formation of heterotrimeric complexes. Functional assays showed robust allosteric interactions that are different when the three receptors are expressed together. Further biochemical and pharmacological assays provided evidence of heterotrimer functional expression in primary cultures of hypothalamic neurons. These findings constitute evidence of a close relationship in the action of the three hormones already starting at the receptor level in the hypothalamus.

KEYWORDS

Anorexigenic, heteromers, G-protein-coupled receptor, GPCR, GPCR heteromer, hypothalamus, Leptin, neuropeptide Y, orexigenic, receptor heteromers.

INTRODUCTION

Neuropeptide Y (NPY)-containing neurons located in the arcuate (ARC) nucleus of the hypothalamus are involved in the regulation of food intake. In fact these NPY-ergic neurons project to the paraventricular and dorsomedial nuclei, which are key in controlling energy balance. Accordingly, administration of NPY into the hypothalamus of rats strongly stimulates intake (Stanley et al. 1986), whereas hypothalamic NPY secretion rises upon fasting (Kalra et al. 1991). Moreover, *in situ* hybridization experiments by double-tagged histochemistry show that 94% of NPY-containing neurons in the ARC nucleus express the GHS receptor mRNA (Willesen, Kristensen, and Rømer 1999). In addition, systemic or intracerebroventricular administration of ghrelin induces Fos expression in neurons of the ARC nucleus, while an antagonist of the NPY receptor Y1 (BIB03304) suppresses the stimulating effect of ghrelin (Nakazato et al. 2001; Shintani et al. 2001; Asakawa et al. 2001; Lawrence et al. 2002). Kohno et al., showed that ghrelin in NPY-containing neurons leads to an increase in intracellular Ca^{2+} levels, which correlate with increased neuronal activity and membrane depolarization (Kohno et al. 2003). Ghrelin is a 28 amino acid peptide acting on a specific G-protein-coupled receptor (GPCR), which is reportedly coupled to heterotrimeric $G_{q/11}$ proteins (www.guidetopharmacology.org). Apart from the pituitary gland, the GHS receptor is widely distributed in the CNS and specially in hypothalamic regions (Guan et al. 1997; Mitchell et al. 2001).

Human leptin, an atypical hormone due to its relatively high molecular weight, is a protein of 167 amino acids produced by adipose tissue (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH69452>). Also known as obesity factor, the hormone acts centrally to decrease NPY-ergic output in the ARC nucleus. In the nineties Wang et al., (Wang et al. 1997; Elmquist et al. 1998) provided evidence of raised plasma levels of leptin upon NPY-induced obesity, and suggested that NPYs were mediating the thermogenic and hypophagic actions of leptin. Reciprocal regulators, also acting via the NPY-ergic system of the hypothalamus, are orexins A and B, also known as, respectively, hypocretins 1 and 2. They are polypeptides of circa 30 amino acids that upon intracerebroventricular administration leads to an over 10-fold increase in food intake (de Lecea et al. 1998; Sakurai et al. 1998; Meier 1998; Muroya et al. 2004).

Orexin receptors are also members of the GPCR superfamily. OX receptor transduction system involves heterotrimeric $G_{q/11}$ proteins (www.guidetopharmacology.org) but other signaling pathways have been reported. Hence, the diversity of effects identified for orexins suggest the involvement in different neuronal types of different G proteins and different effectors (Kukkonen and Leonard 2014). In contrast to the discrete locus of orexin production, orexin receptors are expressed in different regions of the CNS (Marcus and Elmquist 2006).

The leptin receptor has homology to class I cytokine family members and upon establishment of primary structure and discovery of membrane topological arrangements, it was found to be associated with a Janus receptor-associated tyrosine kinase (JAK). Leptin activation drives JAK autophosphorylation and JAK-mediated phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT) members (Sánchez-Margalet et al. 2003). As in similar class I membrane proteins, leptin receptor operation was ascribed to dimer occurrence and/or ligand-receptor dimer formation. It is also known the tendency of these receptors to form macromolecular structures by direct interaction with other receptors or accessory proteins. In sharp contrast, GPCR were characterized assuming that

they were monomers. Identification of complexes formed by different GPCRs have however been reported in the last two decades. Interestingly GPCR heteromers appear as novel transducing devices as they are functionally different than the individual receptors. In fact the ghrelin receptors may form direct protein-protein interactions with dopamine, melanocortin, neurotensin, prostanoid, serotonin, somatostatin and orphan GPCRs (Borroto-Escuela et al., see www.gpcr-hetnet.com and references therein). From the point of view of heteromer biology and pharmacology, orexin receptors have attracted less attention than other members of the GPCR superfamily, and the only described interactions are with the most abundant GPCR in the CNS, namely the cannabinoid CB₁ receptor (Ward, Padiani, and Milligan 2011) and with the corticotropin-releasing factor receptor 1 (Navarro et al. 2015).

Taking into account the above described knowledge, we hypothesized that receptors that are mediating the effects of orexin, ghrelin and leptin in hypothalamic neurons and that are indeed responsible of reciprocal regulations, could be directly and/or functionally interacting. Accordingly, the aim of this paper was to know whether the intricacies of the orexin/leptin regulation of ghrelin action could be already imprinted at the receptor level. Therefore, we first tested in an heterologous expression system whether the human version of the receptors may establish direct physical interactions and the pharmacological and signaling consequences of such interactions. We subsequently demonstrated differential signaling via individual, heterodimeric and heterotrimeric complexes. Finally we obtained convergent evidence of expression of leptin, ghrelin orexin heteroreceptor complexes in primary cultures of hypothalamic neurons in which both leptin and orexin enhanced the ghrelin-receptor mediated signaling. These findings constitute a significant advance in the knowledge of the molecular mechanisms underlying the integration by ARC neurons of orexinergic signals that originate at the periphery.

RESULTS

Ghrelin R1a, leptin and/or orexin OX₁ heteroreceptor complex identification and characterization in an heterologous system

Immunocytochemical assays were first performed to detect whether colocalization between pairs of GHS-R1a, leptin and/or orexin OX₁ receptors occurred in transfected HEK-293T cells. Confocal microscopy obtained in cells expressing LEP-Rluc and GHS-R1a-GFP² showed colocalization between the two receptors (Fig. 1A). Proximity ligation assays (PLAs) are being used as a complementary technique to detect protein-protein interactions in heterologous and native systems. When PLA was used to detect GHS-R1a-GFP² and LEP-Rluc heteroreceptor complexes in co-transfected cells, red dots indicated the presence of such complexes (Fig. 1B). The direct interaction between receptors was assayed by energy transfer biophysical techniques. BRET² was measured using constant amounts of cDNA for LEP-Rluc and different amounts of cDNA for GHS-R1a-GFP². The BRET² signal was significant and increased in parallel with acceptor expression, whereas the negative control, performed using cannabinoid CB₁-Rluc and GHS-R1a-GFP², led to a low and non-significant signal (Fig. 1C). These results show that leptin and ghrelin receptors may establish direct protein-protein interactions in living HEK-293T cells. Functionality was determined by activation of the MAP kinase signaling pathway. Accordingly, ERK1/2 phosphorylation assays were performed in cells treated with either vehicle, 100 ng/mL LEP receptor agonist (leptin), 100 nM GHS-R_{1a} receptor agonist (ghrelin) or both agonists.

pERK1/2 levels expressed in percentages over values from untreated cells indicated that leptin had a negligible effect, whereas GHS-R1a receptor activation led to a significant effect that was significantly decreased by the presence of leptin (Fig. 1D). As expected, activation of the GPCR led to MAP kinase engagement, that was negatively modulated by leptin. Such modulation was not significant when assayed by label-free DMR assays. In these experiments leptin did not induce any response whereas the response exerted by ghrelin was very robust (Fig. 1E). Results of Ca^{2+} mobilization, using a calmodulin-based biosensor, confirmed the ghrelin receptor activation leads to increases in the intracellular Ca^{2+} levels. A functional interaction between LEP and GHS-R1a receptors was identified by the modulation of the kinetics of the ghrelin action on $[\text{Ca}^{2+}]$ in the presence of leptin (Fig. 1F).

Confocal microscopy images obtained in cells expressing GHS-R1a and OX_1 receptor showed colocalization between the two receptors (Fig. 2A). PLA allowed detection of GHS-R1a and OX_1 heteroreceptor complexes in co-transfected cells, red dots indicating the presence of such complexes (Fig. 2B). The direct interaction between receptors was assayed by energy transfer biophysical techniques. BRET² was measured using constant amounts of cDNA for OX_1 -Rluc and different amounts of cDNA for GHS-R1a-GFP². The BRET² signal increased until saturation whereas the negative control, performed using cannabinoid CB_1 -Rluc and GHS-R1a-GFP², led to a low and non-significant signal (Fig. 2C). These results show that orexin and ghrelin receptors may establish direct protein-protein interactions in living HEK-293T cells. Accordingly, ERK1/2 phosphorylation assays were performed in cells treated with either, vehicle, 100 nM OX_1 receptor agonist (orexin A), 100 nM GHS-R_{1a} receptor agonist (ghrelin) or both agonists. pERK1/2 levels expressed in percentages over values from untreated cells indicated that every agonist led a significant effects whereas combined activation led to an intermediate effect (Fig. 2D). Taken together these data indicate that activation of any of the two GPCRs leads to a significant G-protein-mediated signal and that co-activation leads to a negative cross-talk between orexin and ghrelin receptors. The results were qualitatively similar in real-time label-free DMR assays (Fig. 2E) in which the signal exerted by 100 nM ghrelin was stronger than the signal by 100 nM orexin A; again coactivation of the two receptors resulted in a negative cross-talk as the response was not additive and was lower than that obtained in the presence of ghrelin. Results of Ca^{2+} mobilization, using the GCaMP6 biosensor, indicated that ghrelin receptor activation leads to more marked increases in the intracellular Ca^{2+} levels than OX_1 receptor. A negative cross-talk between the two GPCR was once more noticed in Ca^{2+} mobilization assays (Fig. 2F).

Confocal microscopy images from cells expressing LEP-Rluc and OX_1 -YFP showed colocalization between the two receptors (Fig. 3A). When PLA was performed, red dots indicated in the occurrence of LEP and OX_1 heteroreceptor complexes in co-transfected cells (Fig. 3B). ERK1/2 phosphorylation assays were subsequently performed in cells treated with either vehicle, 100 ng/mL LEP receptor agonist (leptin), 100 nM OX_1 receptor agonist (orexin A) or both agonists. The results were qualitatively different from those obtained for the pair of receptors formed by LEP-Rluc and GHS-R1a, i.e. leptin had a negligible effect, and orexin A led to a significant effect that was not modified by the presence of leptin (Fig. 3C). Accordingly, the activation of the GPCR led to MAP kinase engagement, whereas activation of the non-GPCR, the leptin receptor, neither increased ERK1/2 phosphorylation nor affected the GPCR-mediated signal. The results were qualitatively similar in real-time label-free DMR assays (Fig.3D), i.e. orexin A producing a robust signal that was not affected by leptin, which did not exert any effect. Results of Ca^{2+} mobilization, using the biosensor, confirmed the OX_1 receptor activation leads to increases

in the intracellular Ca^{2+} levels. Coactivation of LEP and OX_1 receptors did not result in any change in the strength or in the kinetics of the calcium response produced by orexin A (Fig. 3E).

Taken together, the above-described results indicate that the three receptors may directly interact, in pairs in cells expressing two receptors, and in trimers in cells expressing all three receptors. Also, the functional assays prove that the triple heteromers have certain signaling properties that are unique to it, i.e. different from those displayed by dimers and/or from those displayed by individual receptors.

Evidence of heterotropic ghrelin R1a, leptin and orexin OX_1 receptor interactions in an heterologous system

Assessment of the potential interaction between the three receptors was based on biophysical techniques and on functional assays in HEK-293T cells expressing the three receptors. A confocal-microscopy-based complementary approach was used to detect the formation of macromolecular complexes containing the three receptors (Fig. 4A-B). To this end, cells were transfected with cDNAs for leptin receptors and for ghrelin and orexin receptors fused, respectively, to YFP C- and N-hemiproteins. First of all, ghrelin and orexin receptor heteromerization was confirmed by detecting the fluorescence of YFP, which resulted from complementation between GHS-R1a-cYFP and OX_1 -nYFP. On the other hand, we detected colocalization between these heteromer complexes and Lep-Rluc (Fig. 4B), thus suggesting that the three receptors may interact to form macromolecular complexes in living HEK-293T cells. Sequential resonance energy transfer combines FRET and BRET approaches to detect interactions between three different proteins. Transfection using cDNAs for LEP-Rluc and GHS-R1a-GFP² and increasing amounts of the cDNA for OX_1 -YFP gave an acceptor-dose-dependent positive signal that was not encountered when CB_1 -Rluc was used as BRET donor instead of LEP-Rluc (Fig. 4C). We then speculated that some qualitative or quantitative differential trend could be detected when the three receptors were simultaneously activated. To test this hypothesis, label free experiments and calcium mobilization assays using the calmodulin-based calcium sensor were performed in cells expressing the three receptors. The results shown in Fig. 4D indicate that leptin did not influence the effect of ghrelin or orexin receptor activation. The negative-cross talk between OX_1 and GHS-R1a was not found in these assays and, furthermore, leptin did not affect the DMR signal but it modified the kinetics of calcium responses obtained using orexin A plus ghrelin. ERK1/2 phosphorylation assays were subsequently performed in cells treated with vehicle and agonists, individually or in combination. Remarkably leptin led to a significant degree of ERK1/2 phosphorylation but it abolished the negative cross-talk due to ghrelin and orexin receptor coactivation (Fig. 4E). Finally, a specific signaling feature of leptin signaling, namely STAT phosphorylation, was investigated in cells treated with a combination of agonists. Leptin receptor-mediated STAT phosphorylation was not affected by single or combined action of agonists of GHS-R1a and OX_1 receptor (Fig. 4F). Cross-talk upon receptor coactivation was finally assayed in primary cultures of neurons from hypothalamus. First, label-free assays demonstrated a response to ghrelin and leptin. Despite OX_1 receptors are expressed (see later), orexin A did not lead to any signal. We then investigated the cross-talk using a combination of the ghrelin receptor agonist and either leptin or orexin A. The results were telling as both leptin and orexin A led to a significant increase in the response of ghrelin. The results are noteworthy as neither leptin nor orexin A led to any DMR effect in hypothalamic neurons (Fig. 5A-B). Remarkably, the results were similar to those obtained in triple transfected cells and differ from those

expressing only two receptors, thus indicating that primary neuronal cultures display features that seemingly reflect the occurrence macromolecular complexes formed by orexin, ghrelin and leptin receptors.

DISCUSSION

Interaction between GHS-R1a and OX₁ and other GPCR family members have been described. Thus GHS-R1a and OX₁ may form heterodimers with cannabinoid CB₁ receptors (Ellis et al. 2006) 2006) and with the corticotropin-releasing factor receptor 1 (Navarro et al. 2015), both related with reward mechanisms and mediating addictive states. Interactions with receptors relevant in the basal ganglia and/or limbic circuits have been reported for the GHS-R1a, *inter alia* with dopamine D₁ or D₂ (Kern et al. 2012; Schellekens et al. 2013), melacortin 3 (Rediger et al. 2011), neurotensin 1 (Takahashi et al. 2006) or somatostatin 5 (Park et al. 2012) receptors.

Receptors tyrosine kinase, or receptors that recruit tyrosine kinases, are known to be functional as dimers. LEP receptor is expressed in the cell surface as a homodimer stabilized by disulfide bridges established within the extracellular cytokine receptor homology 2 (CRH2) domains (Peelman et al. 2006). On the one hand, such receptors tend to form aggregates with other membrane proteins. On the other hand, G-protein-independent signaling of GPCRs involves β -arrestin recruitment, receptor endocytosis and regulation of *ras*-related cascades thus impacting on receptor-tyrosine kinase signaling pathways (Lefkowitz and Shenoy 2005). Thus, it is tempting to speculate that GPCR and non-GPCR cell surface receptors may establish direct molecular interactions. Although few, there are already examples of such type of inter-receptor-family interactions; also difficult is to detect interactions involving three different receptors. We pioneered work leading to the detection of triple membrane receptor interactions (Carriba et al. 2008; Rodríguez-Ruiz et al. 2016) and we thought it was worth to investigate whether receptors for hormones that control energy homeostasis at the organism level and that are expressed in the same hypothalamic NPY-ergic neurons, could establish direct receptor-receptor interactions. The results proved the hypothesis of molecular cross-talk due to formation of heteroreceptor complexes, and showed that the functionality of the heteromer is different from that of the individual receptors and also from that of heteromers formed by only two receptors.

Orexinergic input on food intake is modulated by a variety of factors such as circadian rhythms or food palatability (Choi et al. 2010; Inutsuka and Yamanaka 2013). Signaling diversity seems to underlie GPCR heteromer formation. In fact, the pharmacology and the signal transduction parameters of GPCR heterodimers are different from those of the two constituting receptors (Ferré et al. 2009). We here demonstrate a cross-talk in cells expressing two of the receptors that is altered upon the expression of the third receptor in an heterologous system. For instance, in cells expressing the GHS-R1a-OX₁ receptor pair, we found a negative cross-talk that was completely altered upon expression of the LEP receptor. What the results in cells coexpressing two receptors seem to indicate is i) heteromer formation is possible for every two-receptor combination, ii) a cross-talk between GHS-R1a and LEP receptors, iii) a cross-talk between GHS-R1a and OX₁ receptors and iv) a lack of effect of leptin in OX₁ receptor-mediated signaling. Accordingly, the presence of LEP receptors, even when activated with leptin, does not affect the conformation changes needed for signaling via OX₁ receptors. The quaternary structure of

the complex containing the three receptors is responsible for the following changes respect to finding in cells expressing only two receptors: i) the cross-talk between GHS-R1a and LEP disappeared, ii) the cross-talk between GHS-R1a and OX₁ disappeared. In contrast, the lack of effect of leptin on OX₁ receptors was maintained in triple transfected cells. The coupling to the MAP kinase cascade of the complex containing the three receptors is particular of the heteromer; in fact the quaternary structure of heteromers and or trimers condition the kinetics and the strength of ERK1/2 phosphorylation (Ferrada et al. 2009; Moreno et al. 2011).

We here demonstrate that the three receptors are present in primary cultures of hypothalamic neurons and that, more importantly, the signaling properties are similar to those in HEK-293T cells expressing the three receptors. Then, the data suggest that these neurons i) expressed heteroreceptor complexes formed by GHS-R1a, OX₁ and LEP receptors and ii) displayed the heteromer-specific signaling characteristics. Also relevant was marked increase of the ghrelin-receptor-mediated DMR signal when either leptin or orexin was added to the primary cultures. Ghrelin concentration in plasma is subjected to marked variations (300-700 pg/mL ; Cummings et al. 2001). Although orexin levels in both plasma and cerebrospinal fluid are fairly stable (Adam et al. 2002), the hormone concentration is subject to day/night cycle variations: lower levels correlate, in the night, with less need for food intake. From a physiological point of view, activation of orexin receptors at the central level would sustain positive motivation that would in turn underlie the need of further reinforcement (for instance, of more food intake).

Leptin may inhibit the increase in intracellular calcium ion levels whose increase was induced by ghrelin. This finding fits with the inhibitory effect of leptin on orexin and ghrelin actions reported in NPY-producing neurons located in the ARC (Kohno et al. 2003; Kohno, Suyama, and Yada 2008). In summary, our results demonstrate that leptin-orexin-ghrelin cross-modulation starts at the receptor level and that further experimental is needed to know how the expression of the receptors and receptor heteromers in NPY-ergic neurons in the ARC affect the overall control of energy homeostasis in both healthy and anorexic/anorexic conditions.

REFERENCES

Adam, J. A., P. P. C. A. Menheere, F. M. H. van Dielen, P. B. Soeters, W. A. Buurman, and J. W. M. Greve. 2002. "Decreased Plasma Orexin-A Levels in Obese Individuals." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 26 (2): 274–76. doi:10.1038/sj.ijo.0801868.

Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, et al. 2001. "Ghrelin Is an Appetite-Stimulatory Signal from Stomach with Structural Resemblance to Motilin." *Gastroenterology* 120 (2): 337–45.

Carriba, Paulina, Gemma Navarro, Francisco Ciruela, Sergi Ferré, Vicent Casadó, Luigi Agnati, Antoni Cortés, et al. 2008. "Detection of Heteromerization of More than Two Proteins by Sequential BRET-FRET." *Nature Methods* 5 (8): 727–33. doi:10.1038/nmeth.1229.

Chen, Tsai-Wen, Trevor J. Wardill, Yi Sun, Stefan R. Pulver, Sabine L. Renninger, Amy Baohan, Eric R. Schreiter, et al. 2013. "Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity." *Nature* 499 (7458): 295–300. doi:10.1038/nature12354.

Choi, D. L., J. F. Davis, M. E. Fitzgerald, and S. C. Benoit. 2010. "The Role of Orexin-A in Food Motivation, Reward-Based Feeding Behavior and Food-Induced Neuronal Activation in Rats." *Neuroscience* 167 (1): 11–20. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.002.

Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, and D. S. Weigle. 2001. "A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans." *Diabetes* 50 (8): 1714–19.

Ellis, James, John D. Pediani, Meritxell Canals, Sandra Milasta, and Graeme Milligan. 2006. "Orexin-1 Receptor-Cannabinoid CB1 Receptor Heterodimerization Results in Both Ligand-Dependent and -Independent Coordinated Alterations of Receptor Localization and Function." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (50): 38812–24. doi:10.1074/jbc.M602494200.

Elmquist, Joel K., Rexford S. Ahima, Carol F. Elias, Jeffrey S. Flier, and Clifford B. Saper. 1998. "Leptin Activates Distinct Projections from the Dorsomedial and Ventromedial Hypothalamic Nuclei." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (2): 741–46.

Ferrada, Carla, Estefanía Moreno, Vicent Casadó, Gerold Bongers, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Enric I. Canela, et al. 2009. "Marked Changes in Signal Transduction upon Heteromerization of Dopamine D1 and Histamine H3 Receptors." *British Journal of Pharmacology* 157 (1): 64–75. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00152.x.

Ferré, Sergi, Ruben Baler, Michel Bouvier, Marc G. Caron, Lakshmi A. Devi, Thierry Durroux, Kjell Fuxe, et al. 2009. "Building a New Conceptual Framework for Receptor Heteromers." *Nature Chemical Biology* 5 (3): 131–34. doi:10.1038/nchembio0309-131.

Guan, X. M., H. Yu, O. C. Palyha, K. K. McKee, S. D. Feighner, D. J. Sirinathsinghji, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg, and A. D. Howard. 1997. "Distribution of mRNA Encoding the Growth Hormone Secretagogue Receptor in Brain and Peripheral Tissues." *Brain Research. Molecular Brain Research* 48 (1): 23–29.

Hradsky, Johannes, Marina Mikhaylova, Anna Karpova, Michael R. Kreutz, and Werner Zuschratter. 2013. "Super-Resolution Microscopy of the Neuronal Calcium-Binding Proteins Calneuron-1 and Caldendrin." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 963: 147–69. doi:10.1007/978-1-62703-230-8_10.

Inutsuka, Ayumu, and Akihiro Yamanaka. 2013. "The Physiological Role of Orexin/Hypocretin Neurons in the Regulation of Sleep/Wakefulness and Neuroendocrine Functions." *Frontiers in Endocrinology* 4: 18. doi:10.3389/fendo.2013.00018.

Kalra, S. P., M. G. Dube, A. Sahu, C. P. Phelps, and P. S. Kalra. 1991. "Neuropeptide Y Secretion Increases in the Paraventricular Nucleus in Association with Increased Appetite for Food." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (23): 10931–35.

Kern, Andras, Rosie Albarran-Zeckler, Heidi E. Walsh, and Roy G. Smith. 2012. "Apo-Ghrelin Receptor Forms Heteromers with DRD2 in Hypothalamic Neurons and Is Essential for Anorexigenic Effects of DRD2 Agonism." *Neuron* 73 (2): 317–32. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.038.

Kohno, Daisuke, Hong-Zhi Gao, Shinji Muroya, Sakae Kikuyama, and Toshihiko Yada. 2003. "Ghrelin Directly Interacts with Neuropeptide-Y-Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus: Ca²⁺ Signaling via Protein Kinase A and N-Type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk with Leptin and Orexin." *Diabetes* 52 (4): 948–56.

Kohno, Daisuke, Shigetomo Suyama, and Toshihiko Yada. 2008. "Leptin Transiently Antagonizes Ghrelin and Long-Lastingly Orexin in Regulation of Ca²⁺ Signaling in Neuropeptide Y Neurons of the Arcuate Nucleus." *World Journal of Gastroenterology* 14 (41): 6347–54.

Kukkonen, J. P., and C. S. Leonard. 2014. "Orexin/Hypocretin Receptor Signalling Cascades." *British Journal of Pharmacology* 171 (2): 314–31. doi:10.1111/bph.12324.

Lawrence, Catherine B., Amelie C. Snape, Florence M.-H. Baudoin, and Simon M. Luckman. 2002. "Acute Central Ghrelin and GH Secretagogues Induce Feeding and Activate Brain Appetite Centers." *Endocrinology* 143 (1): 155–62. doi:10.1210/endo.143.1.8561.

Lecea, L. de, T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, et al. 1998. "The Hypocretins: Hypothalamus-Specific Peptides with Neuroexcitatory Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 322–27.

Lefkowitz, Robert J., and Sudha K. Shenoy. 2005. "Transduction of Receptor Signals by Beta-Arrestins." *Science (New York, N.Y.)* 308 (5721): 512–17. doi:10.1126/science.1109237.

Marcus, Jacob N., and Joel K. Elmquist. 2006. "Orexin Projections and Localization of Orexin Receptors." In *The Orexin/Hypocretin System*, edited by Seiji Nishino MD and Takeshi Sakurai MD, 21–43. Contemporary Clinical Neuroscience. Humana Press. doi:10.1385/1-59259-950-8:21.

Meier, C. A. 1998. "Orexins and Anorexins: Thoughts for Food." *European Journal of Endocrinology* 139 (2): 148–49.

Mitchell, V., S. Bouret, J. C. Beauvillain, A. Schilling, M. Perret, C. Kordon, and J. Epelbaum. 2001. "Comparative Distribution of mRNA Encoding the Growth Hormone Secretagogue-Receptor (GHS-R) in Microcebus Murinus (Primate, Lemurian) and Rat Forebrain and Pituitary." *The Journal of Comparative Neurology* 429 (3): 469–89.

Moreno, Estefanía, Hanne Hoffmann, Marta Gonzalez-Sepúlveda, Gemma Navarro, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Josefa Mallol, et al. 2011. "Dopamine D1-Histamine H3 Receptor Heteromers Provide a Selective Link to MAPK Signaling in GABAergic Neurons of the Direct Striatal Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (7): 5846–54. doi:10.1074/jbc.M110.161489.

Muroya, Shinji, Hisayuki Funahashi, Akihiro Yamanaka, Daisuke Kohno, Kazuhide Uramura, Tadahiro Nambu, Megumi Shibahara, et al. 2004. "Orexins (Hypocretins) Directly Interact with Neuropeptide Y, POMC and Glucose-Responsive Neurons to Regulate Ca²⁺ Signaling in a Reciprocal Manner to Leptin: Orexigenic Neuronal Pathways in the Mediobasal Hypothalamus." *The European Journal of Neuroscience* 19 (6): 1524–34. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03255.x.

Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, and S. Matsukura. 2001. "A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding." *Nature* 409 (6817): 194–98. doi:10.1038/35051587.

Navarro, Gemma, César Quiroz, David Moreno-Delgado, Adam Sierakowiak, Kimberly McDowell, Estefanía Moreno, William Rea, et al. 2015. "Orexin-Corticotropin-Releasing Factor Receptor Heteromers in the Ventral Tegmental Area as Targets for Cocaine." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (17): 6639–53. doi:10.1523/JNEUROSCI.4364-14.2015.

Park, Seongjoon, Hong Jiang, Hongjie Zhang, and Roy G. Smith. 2012. "Modification of Ghrelin Receptor Signaling by Somatostatin Receptor-5 Regulates Insulin Release." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46): 19003–8. doi:10.1073/pnas.1209590109.

Peelman, Frank, Cyril Couturier, Julie Dam, Lennart Zabeau, Jan Tavernier, and Ralf Jockers. 2006. "Techniques: New Pharmacological Perspectives for the Leptin Receptor." *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (4): 218–25. doi:10.1016/j.tips.2006.02.009.

Rediger, Anne, Carolin L. Piechowski, Chun-Xia Yi, Patrick Tarnow, Rainer Strotmann, Annette Grütters, Heiko Krude, et al. 2011. "Mutually Opposite Signal Modulation by Hypothalamic Heterodimerization of Ghrelin and Melanocortin-3 Receptors." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (45): 39623–31. doi:10.1074/jbc.M111.287607.

Rodríguez-Ruiz, Mar, Estefanía Moreno, David Moreno-Delgado, Gemma Navarro, Josefa Mallo, Antonio Cortés, Carme Lluís, et al. 2016. "Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease." *Molecular Neurobiology*, July. doi:10.1007/s12035-016-9995-y.

Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, et al. 1998. "Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior." *Cell* 92 (4): 573–85.

Sánchez-Margalet, V., C. Martín-Romero, J. Santos-Alvarez, R. Goberna, S. Najib, and C. Gonzalez-Yanes. 2003. "Role of Leptin as an Immunomodulator of Blood Mononuclear Cells: Mechanisms of Action." *Clinical and Experimental Immunology* 133 (1): 11–19.

Schellekens, Harriët, Wesley E. P. A. van Oeffelen, Timothy G. Dinan, and John F. Cryan. 2013. "Promiscuous Dimerization of the Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R1a) Attenuates Ghrelin-Mediated Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (1): 181–91. doi:10.1074/jbc.M112.382473.

Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, et al. 2001. "Ghrelin, an Endogenous Growth Hormone Secretagogue, Is a Novel Orexigenic Peptide That Antagonizes Leptin Action through the Activation of Hypothalamic Neuropeptide Y/Y1 Receptor Pathway." *Diabetes* 50 (2): 227–32.

Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert, and S. F. Leibowitz. 1986. "Neuropeptide Y Chronically Injected into the Hypothalamus: A Powerful Neurochemical Inducer of Hyperphagia and Obesity." *Peptides* 7 (6): 1189–92.

Takahashi, Koji, Chiyuki Furukawa, Atsushi Takano, Nobuhisa Ishikawa, Tatsuya Kato, Satoshi Hayama, Chie Suzuki, et al. 2006. "The Neuromedin U-Growth Hormone Secretagogue Receptor 1b/Neurotensin Receptor 1 Oncogenic Signaling Pathway as a Therapeutic Target for Lung Cancer." *Cancer Research* 66 (19): 9408–19. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1349.

Wang, Q., C. Bing, K. Al-Barazani, D. E. Mossakowaska, X. M. Wang, D. L. McBay, W. A. Neville, et al. 1997. "Interactions between Leptin and Hypothalamic Neuropeptide Y Neurons in the Control of Food Intake and Energy Homeostasis in the Rat." *Diabetes* 46 (3): 335–41.

Ward, Richard J., John D. Padiani, and Graeme Milligan. 2011. "Heteromultimerization of Cannabinoid CB(1) Receptor and Orexin OX(1) Receptor Generates a Unique Complex in Which Both Protomers Are Regulated by Orexin A." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37414–28. doi:10.1074/jbc.M111.287649.

Willesen, M. G., P. Kristensen, and J. Rømer. 1999. "Co-Localization of Growth Hormone Secretagogue Receptor and NPY mRNA in the Arcuate Nucleus of the Rat." *Neuroendocrinology* 70 (5): 306–16.

Zimmermann, Timo, Jens Rietdorf, Andreas Girod, Virginie Georget, and Rainer Pepperkok. 2002. "Spectral Imaging and Linear Un-Mixing Enables Improved FRET Efficiency with a Novel GFP2-YFP FRET Pair." *FEBS Letters* 531 (2): 245–49.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Leptin was purchased from Prospec (Ness-Ziona, Israel), and orexin-A and ghrelin from Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Cell Lines and Neuronal Primary Cultures

HEK-293T cells were grown in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Halethorpe, MD) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin/streptomycin, minimum Eagle's medium non-essential amino acid solution (1/100) and 5% (v/v) heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Primary cultures of hypothalamic nucleus neurons were obtained from fetal Sprague-Dawley rats (embryonic day 19). Cells were isolated as described in (Hradsky et al. 2013) and plated at a confluence of 10,000 cells/well in 384-

well sensor microplates for DMR experiments. Cells were maintained in Neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin/streptomycin, and 2% (v/v) B27 supplement (Gibco) for 12 days.

Expression Vectors and Fusion Proteins

Sequences encoding amino acid residues 1-155 and 155-238 of the Venus variant of YFP were subcloned in the pcDNA3.1 vector to obtain YFP hemitruncated protein. Human cDNAs for GHS-R1a, OX₁ receptor, LEP receptor and cannabinoid CB₁ receptor, cloned into pcDNA3.1, were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring the following: EcoRI and KpnI sites to clone GHS-R1a receptors in a GFP²-containing vector (p-GFP², Packard BioScience, Meriden, CT); BamHI and EcoRI sites to clone CB₁ receptor, HindIII and BamHI sites to clone LEP receptor and EcoRI and KpnI sites to clone OX₁ receptor in the pcDNA3.1RLuc vector (pRLuc-N1, PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA); EcoRI and KpnI sites to clone OX₁ receptor in pEYFP-N1 vector (enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany). Amplified fragments were subcloned to be in-frame with restriction sites of pRLuc-N1, pEYFP-N1, or p-GFP² vectors to provide plasmids that express proteins fused to RLuc, YFP, or GFP² on the C-terminal end (GHS-R1a-GFP², CB₁-RLuc, OX₁-RLuc, LEP-RLuc and OX₁-YFP). For bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments, cDNA for OX₁ receptor was subcloned into pcDNA3.1-nVenus and cDNA for GHS-R1a was subcloned into pcDNA3.1-cVenus to provide plasmids that express the receptor fused to the hemitruncated nYFP Venus or cYFP Venus on the C-terminal end of the receptor (OX₁-nYFP and GHS-R1a-cYFP).

Cell Transfection

HEK-293T cells growing in 6-well dishes or 25 cm² flasks were transiently transfected with the corresponding protein cDNA by the PEI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) method. Cells were incubated with the corresponding cDNA together with PEI (5.47 mM in nitrogen residues) and 150 mM NaCl in a serum-starved medium. After 4 h, the medium was changed to a fresh complete culture medium. Cells were maintained at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

Resonance Energy Transfer-based Assays

For BRET assays, HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant cDNA encoding for receptor-RLuc and with increasing amounts of cDNA corresponding to receptor-GFP². 24 h after transfection, cells were adjusted to 20 µg of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin for standardization. To quantify fluorescence proteins, cells were distributed in 96-well black microplates with a transparent bottom (Corning 3600, Corning, NY), and the fluorescence was read in a Fluostar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp using a 10 nm bandwidth excitation filter at 410 nm for receptor-GFP² reading. Receptor fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing receptor-RLuc alone. For BRET measurements, cells were distributed in 96-well white microplates with white bottoms (Corning) and 5 µM of DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) were added. Immediately after addition of DeepBlueC, BRET was determined using a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 400 nm and the long-wavelength filter

at 510 nm. To quantify protein-RLuc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5 μ M DeepBlueC addition using a Mithras LB 940. The net BRET is defined as $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]-C_f$, where C_f corresponds to $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]$ for the donor construct expressed alone in the same experiment. GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA) was used to fit data. BRET is expressed as mili BRET units, mBU (net BRET x 1,000). For sequence resonance energy transfer (SRET) assays (Carriba et al. 2008), HEK-293T cells were transiently co-transfected with constant amounts of cDNAs encoding for LEP receptor fused to RLuc or CB₁ receptor fused to RLuc for the negative control, GHS-R1a fused to GFP² and with increasingly amounts of cDNA corresponding to OX₁ receptor fused to YFP. For SRET, cells were distributed in 96-well microplates, and 5 μ M DeepBlueC was added. The SRET signal was collected using a Mithras LB 940 reader with detection filters for short wavelength (410 nm) and long wavelength (530 nm). By analogy with BRET, net SRET is defined as $[(\text{long wavelength emission})/(\text{short wavelength emission})]-C_f$, where C_f corresponds to $[(\text{long wavelength emission})/(\text{short wavelength emission})]$ for cells expressing protein-RLuc and protein-GFP². Linear unmixing was done for SRET quantification, taking into account the spectral signature to separate the two fluorescence emission spectra (Zimmermann et al. 2002) GraphPad Prism software was used to fit data. SRET is expressed as milliSRET units (mSU; net SRET x 1000).

Immunocytochemistry

Transiently transfected HEK-293T cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed twice with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. After permeabilization with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were treated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, cells expressing receptor-RLuc were labeled with a primary mouse monoclonal anti-RLuc antibody (1/100, EMD Millipore, Darmstadt, Germany) for 1 h, washed, and stained with a secondary antibody for Cy3 donkey anti-mouse (1/100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD). Receptors fused to YFP, GFP² and cYFP-nYFP were detected by their fluorescent properties. Cell nuclei were stained with Hoescht (Sigma-Aldrich). Samples were washed, mounted with 30% Mowiol (Calbiochem) and observed under a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Scale bar: 20 μ m.

ERK phosphorylation assays

HEK-293T cells were grown in 25-cm² flasks to 80% confluence and cultured in serum-free medium for 4 h before the addition of any agent. Cells were treated or not with the indicated ligand diluted in serum-free medium supplemented with bovine serum albumin 0.01 % for the indicated time and were rinsed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed by the addition of 300 μ l of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 μ M phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO₄ and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 5 min at 4 °C, and the protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as a standard. To determine the degree of protein phosphorylation, equivalent amounts of protein were separated by electrophoresis on a denaturing 10 % SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF-FL membranes. Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) was then added, and the membrane was rocked for 90 min. The membranes were then probed overnight with a mixture of a mouse anti-phospho-

ERK1/2 antibody (1:2500; Sigma-Aldrich) and a rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both phosphorylated and unphosphorylated ERK1/2 (1:40,000; Sigma-Aldrich). The 42- and 44-kDa bands corresponding to ERK1 and ERK2 were visualized by the addition of a mixture of IRDye 800 (anti-mouse) antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich) and IRDye 680 (anti-rabbit) antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich) for 2 h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). Band densities were quantified using the scanner software and exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). The level of phosphorylated ERK1/2 isoforms was normalized for differences in loading using the total ERK1/2 protein band intensities. Statistical differences between the different groups were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's correction.

Dynamic mass redistribution assays (DMR)

Cell mass redistribution induced upon receptor activation were detected by illuminating the underside of a biosensor with polychromatic light and measuring the changes in the wavelength of the reflected monochromatic light that is a sensitive function of the index of refraction. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) is directly proportional to the amount of DMR. HEK-293T cells and hypothalamic primary cultures were seeded in 384-well sensor microplates to obtain 70-80% confluent monolayers constituted by approximately 10,000 cells per well. Previous to the assay, cells were washed twice with assay buffer (HBSS with 20 mM HEPES, pH 7.15) and incubated 2 h with assay-buffer (24°C, 30 μ l/well). Hereafter, the sensor plate was scanned and a baseline optical signature was recorded for 10 min before adding 10 μ l of the specific agonists; all test compounds were dissolved in assay buffer. The cell signaling signature was determined using an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer) by a label-free technology. Then, DMR responses were monitored for at least 4,000 s. Results were analyzed using EnSpire Workstation Software v 4.10.

***In situ* proximity ligation assays**

HEK-293T transfected cells grown on glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups and permeabilized with the same buffer containing 0.05% Triton X-100 (5 min treatment). Heteromers were detected using the Duolink II *in situ* PLA detection Kit (OLink Bioscience) following the instructions of the supplier. To detect LEP-RLuc-GHS-R1a-GFP², OX₁-RLuc-GHS-R1a-GFP² and LEP-RLuc-OX₁-YFP heteromers, a mixture of equal amounts of rabbit anti-RLuc antibody (EMD Millipore) and mouse anti-YFP antibody (Santa Cruz Biotechnology) was used and incubated with anti-rabbit plus and anti-mouse minus PLA probes. Cells were mounted using the mounting medium with Hoechst (1/200; SigmaAldrich). The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (numerical aperture 1.4) and 405 and 561 nm laser lines. For each field of view, a stack of two channels (one per staining) and 3 to 5 Z stacks with a step size of 1 μ m were acquired. Images were opened and processed with NIH Image J confocal.

Intracellular Calcium Release

Cells were co-transfected with the cDNA for the indicated receptors and 1.5 μ g of GCaMP6 calcium sensor (Chen et al. 2013) using the PEI method. 24h after transfection, 150,000 cells/well in 96-well black, clear-bottom microtiter plates were incubated with Mg⁺²-free Locke's buffer (pH 7.4) (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM

CaCl₂, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 μM glycine, and receptor ligands were added as indicated. The fluorescence emission intensity of GCaMP6 was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on the EnSpire® multimode plate reader for 335 s every 15 s and 100 flashes/well.

FIGURE LEGENDS

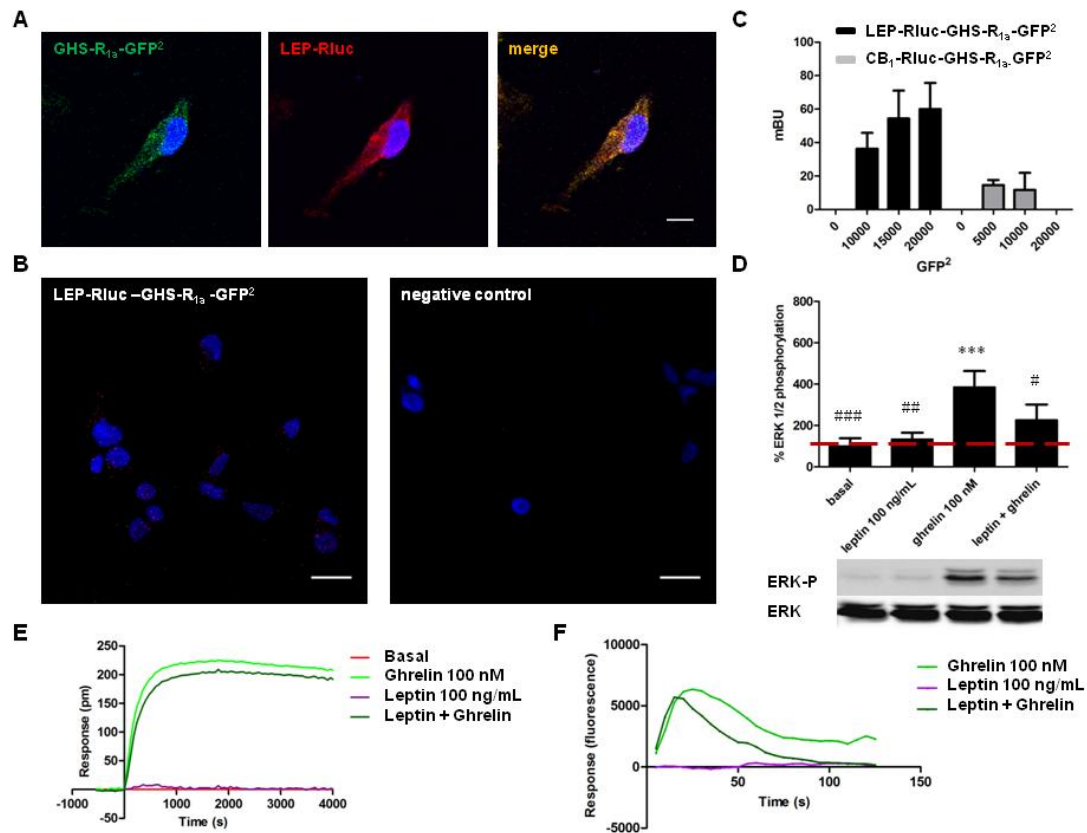


Figure 1. Expression and functional characterization of LEP-GHS-R_{1a} receptor heteromers in HEK-293T cells. Panel A: Confocal microscopy images of HEK-293T cells co-transfected with GHS-R_{1a}-GFP² cDNA (1.5 μg) and LEP-Rluc cDNA (2.5 μg). GHS-R_{1a}-GFP² was identified by its own fluorescence (green) and LEP-Rluc by a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization of both receptors is shown in yellow. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars = 10 μm. Panel B: Representative result of an *in situ* proximity ligation assays (PLA) in cells coexpressing GHS-R_{1a}-GFP² and LEP-Rluc. In the confocal microscopy image (three superimposed sections) LEP-GHS-R_{1a} heteroreceptor complexes appear as red spots. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). As negative control, PLA was performed in the absence of primary antibody. Scale bars = 20 μm. Panel C: LEP-GHS-R_{1a} receptor heteromers were detected by BRET² saturation experiments in HEK-293T cells co-transfected with a fixed amount of cDNA for LEP-Rluc (4 μg) and increasing amounts of cDNA for GHS-R_{1a}-GFP² (0.5 to 3 μg). Values are the mean ± SEM of 6 to 8 different experiments grouped as a function of the amount of BRET² acceptor. As negative control, a low and non-saturable BRET² relationship was obtained by transfecting the cDNA (0.7 μg) for the CB₁ receptor fused to Rluc, the BRET² donor. Panels D-F: Functional characterization of LEP-GHS-R_{1a} receptor heteromers in HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for GHS-R_{1a}-GFP² (3 μg) and LEP-Rluc (4.5 μg). Cells were treated with either vehicle, 100 ng/mL LEP receptor agonist (leptin), 100 nM GHS-R_{1a} receptor agonist (ghrelin) or both agonists. Panel D: ERK1/2 phosphorylation is expressed in percentages over values from untreated cells (mean ± SEM, n = 4 to 6). A representative Western blotting is shown (bottom). One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple

comparison test showed a significant effect of ghrelin over untreated cells (**p < 0.001) and a significant effect over ghrelin-treated cells (#p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001). Panel E: Representative dynamic mass redistribution (DMR) read-outs. The resulting picometer-shifts of reflected light wavelength (pm) *vs* time were monitored (data from in triplicates; n = 3). Panel F: Fluorometrical determination of cytosolic Ca²⁺ free concentration in HEK-293T cells transfected with 1.5 µg cDNA for GCaMP6 calcium sensor. Representative curves of a real-time variation of Ca²⁺ levels (data from triplicates; n=4).

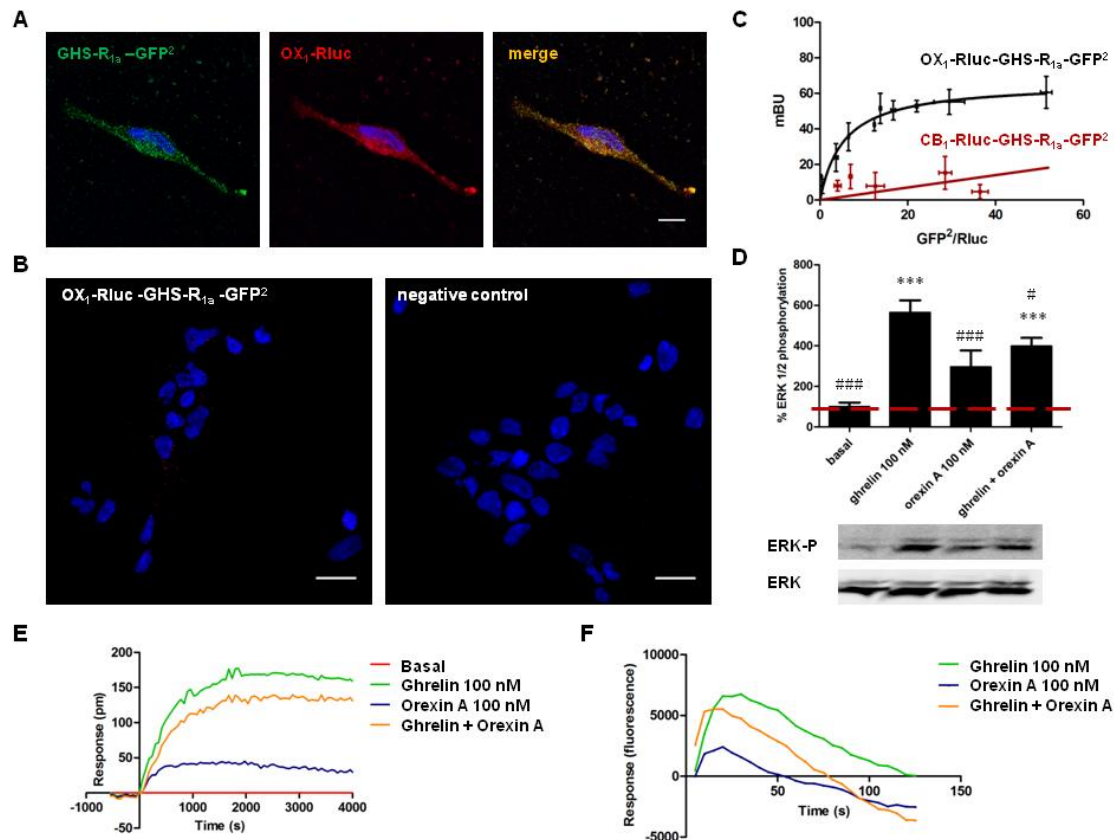


Figure 2. Expression and functional characterization of GHS-R_{1a}-OX₁ receptor heteromers in HEK-293T cells. Panel A: Confocal microscopy images of HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for GHS-R_{1a}-GFP² (1.5 μg) and OX₁-Rluc cDNA (0.75 μg). GHS-R_{1a}-GFP² was identified by its own fluorescence (green) and OX₁-Rluc by a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization of both receptors is shown in yellow. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars = 10 μm. Panel B: Representative result of an *in situ* proximity ligation assays (PLA) in cells coexpressing GHS-R_{1a}-GFP² and OX₁-Rluc. In the confocal microscopy image (three superimposed sections) GHS-R_{1a}-OX₁ heteroreceptor complexes appear as red spots. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). As negative control, PLA were performed in the same cells in the absence of primary antibody. Scale bars = 20 μm. Panel C: GHS-R_{1a}-OX₁ receptor heteromers were detected by BRET² saturation experiments in HEK-293T cells co-transfected with a fixed amount of OX₁-Rluc cDNA (0.4 μg) and increasing amounts of GHS-R_{1a}-GFP² (0.5 to 4 μg). Values are the mean ± SEM of 6 to 8 different experiments grouped as a function of the amount of BRET² acceptor. As negative control, linear and low BRET² values was obtained by transfecting the cDNA corresponding to CB₁ receptor fused to Rluc (0.7 μg) as a BRET² donor. Panels D-F: Functional characterization of GHS-R_{1a}-OX₁ receptor heteromers in HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for GHS-R_{1a}-GFP² (3 μg) and OX₁-Rluc (1.5 μg). Cells were treated with either vehicle, 100 nM OX₁ receptor agonist (orexin A), 100 nM GHS-R_{1a} receptor agonist (ghrelin) or both agonists. Panel D: ERK1/2 phosphorylation is expressed in percentages over values from untreated cells (mean ± SEM, n = 4 to 6). A representative Western blotting is shown (bottom). One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test showed a significant effect of ghrelin and the co-activation over untreated cells (**p < 0.001) and a significant decrease compared with ghrelin-treated cells (#p < 0.05, ###p < 0.001). Panel E: Representative dynamic mass redistribution (DMR) read-

outs. The resulting picometer-shifts of reflected light wavelength (pm) *vs* time were monitored (data from in triplicates; n = 3). Panel F: Fluorometrical determination of cytosolic Ca²⁺ free concentration in HEK-293T cells transfected with 1.5 µg cDNA for GCaMP6 calcium sensor. Representative curves of a real-time variation of Ca²⁺ levels (data from triplicates; n = 4).

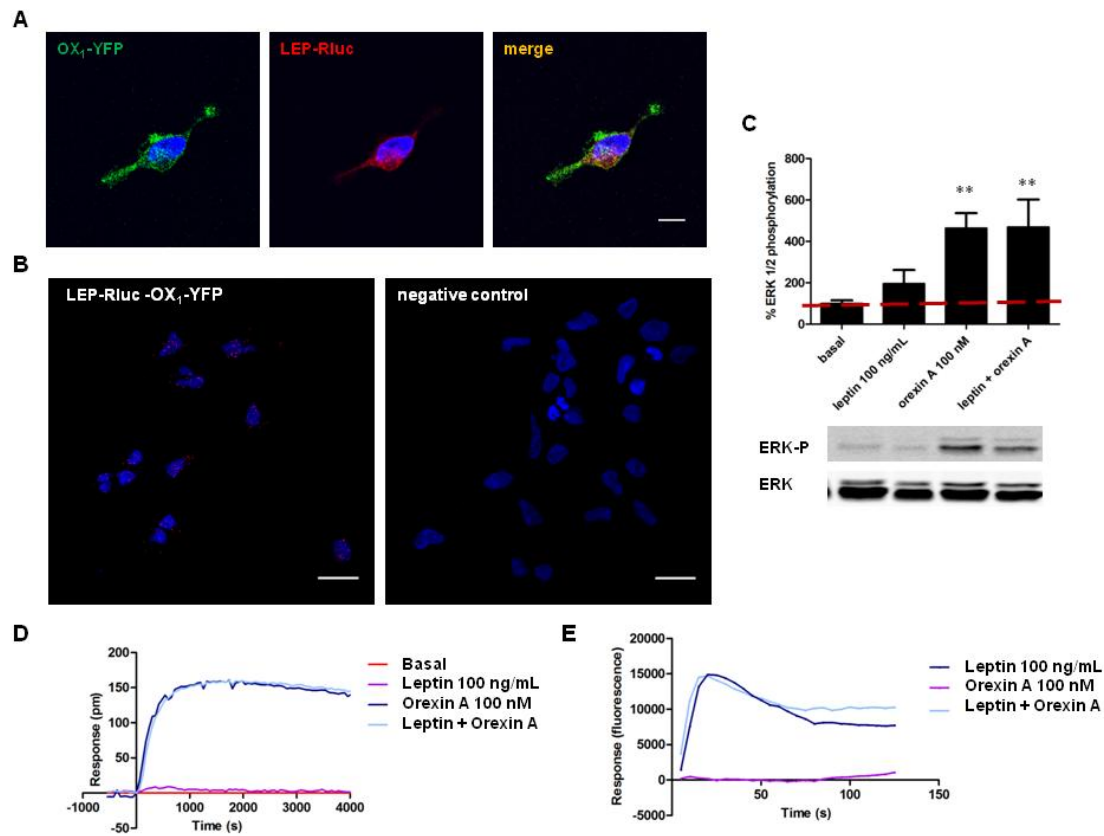


Figure 3. Expression and functional characterization of LEP-OX₁ receptor heteromers in HEK-293T cells. Panel A: Confocal microscopy images of HEK-293T cells co-transfected with LEP-Rluc cDNA (2.5 µg) and OX₁-YFP cDNA (0.75 µg). OX₁-YFP was identified by its own fluorescence (green) and LEP-Rluc by a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization of both receptors is shown in yellow. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars = 10 µm. Panel B: Representative result of an *in situ* proximity ligation assays (PLA) in cells coexpressing OX₁ and LEP-Rluc. In the confocal microscopy image (three superimposed sections) LEP-OX₁ heteroreceptor complexes appear as red spots. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). As negative control, PLA was performed in the absence of primary antibody. Scale bars = 20 µm. Panels C-E: Functional characterization of LEP-OX₁ receptor heteromers in HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for OX₁-YFP (2 µg) and LEP-Rluc (4 µg). Cells were treated with either vehicle, 100 nM OX₁ receptor agonist (orexin A), 100 ng/mL LEP receptor agonist (leptin) or both agonists. Panel C: ERK1/2 phosphorylation is expressed in percentages over values from untreated cells (mean ± SEM, n = 4 to 6). A representative Western blotting is shown (bottom). One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test showed a significant effect of orexin A and the coactivation over untreated cells (**p < 0.01). No significant differences were detected between activation with orexin A and co-activation. Panel D: Representative dynamic mass redistribution (DMR) read-outs. The resulting picometer-shifts of reflected light wavelength (µm) *vs* time were monitored (data from in triplicates; n = 3). Panel E: Fluorometrical determination of cytosolic Ca²⁺ free concentration in HEK-293T cells transfected with 1.5 µg cDNA for GCaMP6 calcium sensor. Representative curves of a real-time variation of Ca²⁺ levels (data from triplicates; n = 4).

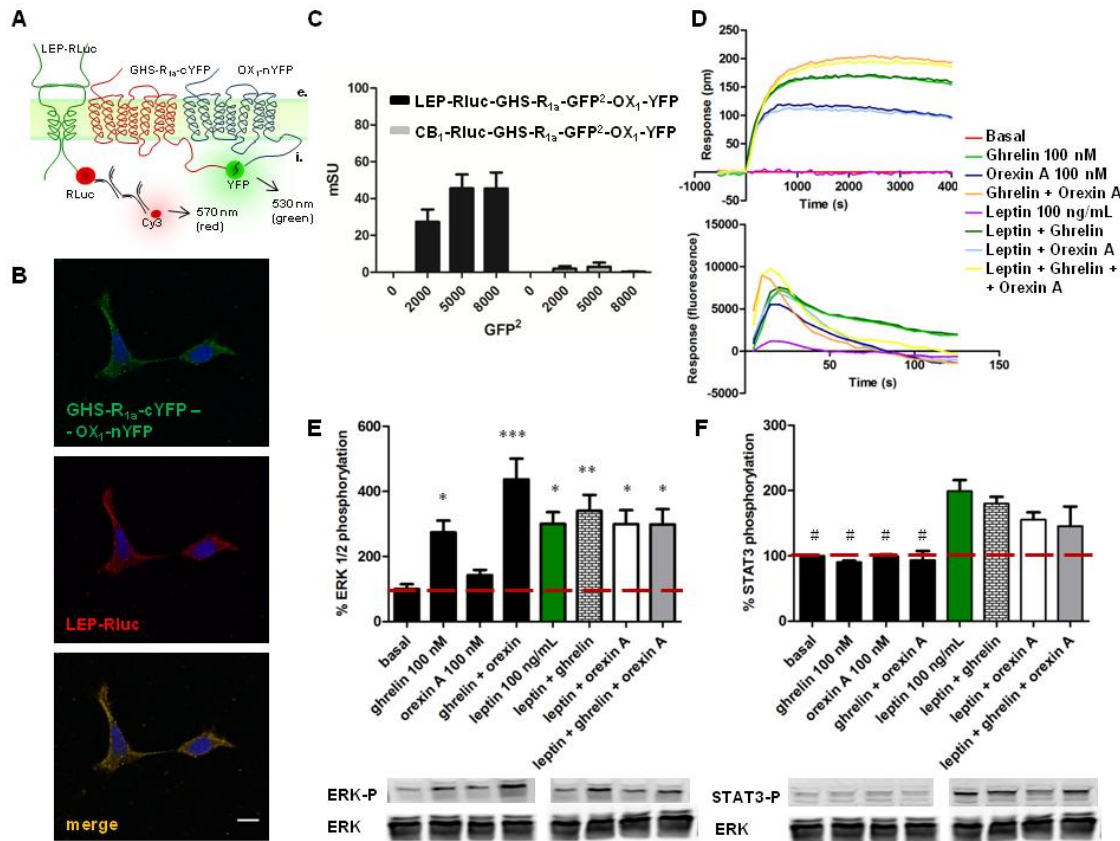


Figure 4. Expression and functional characterization of LEP-GHS-R_{1a}-OX₁ receptor oligomers in HEK-293T cells. Panel A: schematic representation of the BiFC analysis. Panel B: confocal-microscopy-based complementary approach in HEK-293T cells co-transfected with LEP-Rluc cDNA (1.75 μ g), GHS-R_{1a}-cYFP cDNA (1.5 μ g) and OX₁-nYFP cDNA (0.6 μ g). GHS-R_{1a}-cYFP and OX₁-nYFP were identified by detecting the fluorescence of the reconstituted YFP (green) and LEP-Rluc by a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization of the three receptors is shown in yellow. Cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bars = 10 μ m. Panel C: LEP-GHS-R_{1a}-OX₁ receptor oligomers were detected by SRET saturation experiments in HEK-293T cells co-transfected with a fixed amount of cDNA for LEP-Rluc cDNA (4.5 μ g) and for GHS-R_{1a}-GFP² (2 μ g) and increasing amounts of cDNA for OX₁-YFP (0.5 to 4 μ g). Values are the mean \pm SEM of 6 to 8 different experiments grouped as a function of the amount of SRET final acceptor. As negative control, a low and non-saturable SRET relationship was obtained by transfecting the cDNA for the CB₁ receptor fused to Rluc (0.3 μ g) as BRET/SRET first donor. Panels D-F: Functional characterization of LEP-GHS-R_{1a}-OX₁ receptor oligomers in HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for LEP-Rluc (4 μ g), for GHS-R_{1a}-GFP² (3 μ g) and for OX₁-Rluc (2.5 μ g). Cells were treated with vehicle or 100 ng/mL LEP receptor agonist (leptin), 100 nM GHS-R_{1a} receptor agonist (ghrelin), OX₁ receptor agonist (orexin A) individually or in combination. Panel D: Representative dynamic mass redistribution (DMR) read-outs. The resulting picometer-shifts of reflected light wavelength (μ m) *vs* time were monitored (data from in triplicates; n = 3) (top). Fluorometrical determination of cytosolic Ca²⁺ free concentration in HEK-293T cells transfected with 1.5 μ g cDNA for GCaMP6 calcium sensor. Representative curves of a real-time variation of Ca²⁺ levels (data from triplicates; n = 4) (bottom). Panels E-F: ERK1/2 (E) or STAT3 (F) phosphorylation is expressed as a percentage over values found in untreated cells (mean \pm SEM, n = 4 to 6).

Representative Western blotting analyses are shown (bottom). One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test showed a significant effect over non-treated cells (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) and over leptin-treated cells (#p < 0.05).

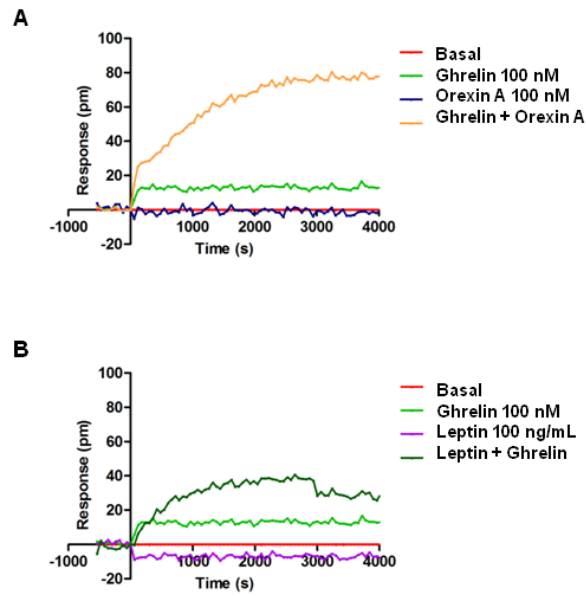


Figure 5. Functional characterization of LEP-GHS-R_{1a}-OX₁ receptor oligomers in hypothalamic primary cultures. Panel A-B: representative dynamic mass redistribution (DMR) assay of $n = 3$ different experiments. Cells were treated with vehicle or the LEP receptor agonist leptin (500 ng/mL), the GHS-R1a receptor agonist ghrelin (500 nM) or the OX₁ receptor agonist orexina A (500 nM). The resulting picometer-shifts of reflected light wavelength (pm) *vs* time were monitored. Each curve is the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicates.

3.2. *Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, orexin receptor OX₁ and CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex.*

Gemma Navarro*, **Mireia Medrano***, David Aguinaga, Ignacio Vega-Quiroga, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Katia Gysling, Rafael Franco.

Manuscrito en preparación para ser enviado a *Neuropharmacology*

El estrés es uno de los factores que subyacen a los comportamientos relacionados con la búsqueda de drogas y a menudo se presenta conjuntamente con pérdida de apetito. En este trabajo demostramos que el receptor de orexina OX₁ puede formar complejos heteroméricos con el receptor del factor liberador de corticotropina CRF₂. Hemos descrito un *cross*-antagonismo y un bloqueo por parte de CRF de la señalización mediada por el receptor OX₁ como características específicas del complejo heteromérico. En células que expresan uno de los receptores, el tratamiento con anfetamina incrementó la señalización dependiente e independiente de proteína G mediada por agonista. Los receptores sigma σ_1 y σ_2 , a pesar de compartir un nombre similar, carecen de relación estructural y, aunque son dianas de distintas drogas de abuso, su papel fisiológico sigue siendo desconocido. En este trabajo mostramos que los receptores σ_1 interactúan con los receptores CRF₂ y que los receptores OX₁ interactúan con los receptores σ_2 . Además, mostramos que el efecto de la anfetamina sobre los receptores CRF₂ estuvo mediado por σ_1 R mientras el efecto sobre los receptores OX₁ estuvo mediado por σ_2 R. La anfetamina potenció el *cross-talk* negativo que se observa en el contexto de la formación del heterómero de receptores CRF₂-OX₁, probablemente a través de la formación de un complejo heteromérico que implica ambos receptores sigma y ambos GPCRs. Finalmente, experimentos de microdiálisis *in vivo* mostraron que la anfetamina potenció la liberación extracelular de dopamina y glutamato inducida por orexina A en el área tegmental ventral (VTA). De manera notable, los efectos de la orexina A *in vivo* fueron bloqueados por un antagonista selectivo del receptor CRF₂. Estos resultados muestran que la anfetamina afecta la señalización mediada por los receptores OX₁, CRF₂ y por el complejo heteromérico CRF₂-OX₁, y que el *cross*-antagonismo constituye una herramienta única para la detección de heterómeros de GPCRs *in vivo*.

DIFFERENTIAL EFFECT OF AMPHETAMINE OVER CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR RECEPTOR CRF₂, OREXIN RECEPTOR OX₁ AND CRF₂-OX₁ HETERORECEPTOR COMPLEX.

Gemma Navarro*^{2,3}, Mireia Medrano*^{1,2}, David Aguinaga^{1,2}, Ignacio Vega-Quiroga⁴, Enric I. Canela^{1,2}, Josefa Mallol^{1,2}, Katia Gysling⁴, Rafael Franco^{1,2}.

Affiliations:

1. Molecular Neurobiology laboratory. Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine. University of Barcelona. Spain.
2. Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. Spain.
3. Department of Biochemistry and Physiology. Pharmacy School. University of Barcelona. Spain.
4. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

* Equal contribution

Corresponding author:

Rafael Franco

rfranco123@gmail.com rfranco@ub.edu

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Diagonal 643. Preosti Building. 08028 Barcelona. Spain.

+34 934021208

SUMMARY

Stress is one of the factors underlying drug seeking behavior that often goes in parallel with loss of appetite. We here demonstrate that orexin 1 receptors (OX₁R) may form heteromeric complexes with the corticotropin releasing factor CRF₂ receptor. Two specific features of the heteromer were a cross-antagonism and a blockade by CRF of OX₁R signaling. In cells expressing one of the receptors, agonist-mediated G-protein-dependent and G-protein-independent signaling were increased by amphetamine. Sigma σ_1 and σ_2 receptors are targets of drugs of abuse and, despite sharing a similar name, the two receptors are structurally unrelated and their physiological role is not known. We here showed that σ_1 receptors interact with CRF₂ receptors and that σ_2 receptors interact with OX₁R. Moreover, we show that amphetamine effect on CRF₂ receptors was mediated by σ_1 R whereas the effect on OX₁ receptors was mediated by σ_2 R. Amphetamine did potentiate the negative cross-talk occurring within the CRF₂-OX₁ receptor heteromer context, likely by a heteroreceptor complex involving the two sigma receptors and the two GPCRs. Finally, *in vivo* microdialysis experiments showed that amphetamine potentiated orexin A-induced dopamine and glutamate release in the *ventral tegmental area* (VTA). Remarkably, the *in vivo* orexin A effects were blocked by a selective CRF₂R antagonist. These results show that amphetamine impacts on the OX₁R-, CRF₂R- and OX₁R/CRF₂R-mediated signaling and that cross-antagonism is a unique tool for *in vivo* detection of GPCR heteromers.

KEYWORDS

Heteromers, G-protein-coupled receptor, GPCR, GPCR heteromer, stress, addiction, amphetamine, orexin, sigma receptors

INTRODUCTION

The first reference to a possible involvement of orexins in the effects of drugs of abuse appeared in 2003 and showed that orexinergic neurons respond to the chronic administration of morphine and its abrupt withdrawal caused by opioid antagonists (Georgescu et al., 2003). Subsequent studies examined the potential role of orexinergic peptides in the reward mechanism associated with consumption of drugs of abuse. It is today accepted that orexins have an important role in responses conditioned to stimuli associated with food and drug reward (Aston-Jones et al., 2010; Harris et al., 2005). The exact nature of the effects of orexins in this context is unknown because of their complex involvement in different aspects of drug addiction, aversive or appetitive motivation, interactions with Pavlovian or instrumental learning processes and induced hedonic states.

Stress and drug addiction correlate in advanced societies. Therefore, the mechanisms of stress and of reward must be interconnected. A relevant regulator of stress responses is the corticotropin releasing factor (CRF), which is one of the main players in the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Gallagher et al., 2008). CRF is a peptide synthesized and secreted by the hypophysiotropic neurons that, in response to stress, is released into the pituitary portal veins that give access to the anterior pituitary gland. There, CRF activates its cognate receptors and induces the release of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) into the systemic circulation, where it travels to its main target, the adrenal gland. ACTH stimulates the synthesis and secretion of glucocorticoids in the adrenal cortex (Bamberger et al., 1996). In fact, the actions of glucocorticoids are mediated by two receptors: glucocorticoid (GR) receptors and mineral corticoid (MR) receptors widely expressed in the brain, including areas involved in emotion, memory, and behavior such as the septum, hippocampus, and prefrontal cortex (Morimoto et al., 1996; Viengchareun et al., 2007).

A first aim of this paper was to investigate whether a drug of addiction, namely amphetamine, affected the response of orexin or of CRF receptors in a heterologous system. As orexin and CRF receptors belong to the superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCR), G-protein-dependent and –independent signaling pathways were analyzed. As GPCRs often form heteromeric complexes, the potential of receptors to form direct receptor-receptor interactions was assayed and proved.

Sigma 1 receptors (σ_1R) are an atypical type of membrane receptors whose exact function is not known. They have been proposed as pluripotent modulator in living cells (Su et al., 2016) and research on this protein is gaining momentum due to its potential as target to combat neuropathic pain (Corbera et al., 2006; Mei and Pasternak, 2002; Sun et al., 2016). In fact, the three-dimensional structure has been recently elucidated. σ_1R protomers, with a single transmembrane domain and a C-terminal tail having a cupin-like β -barrel with a buried ligand-binding site, arrange into homotrimers (Schmidt et al., 2016). Interestingly, it is a neurophysiological target of different drugs of abuse, cocaine and metamphetamine among them (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005). Due to the reports showing that σ_1R may interact with metabotropic receptors for a variety of hormones/neurotransmitters, it is tempting to speculate that the role of the receptor may be regulating the expression and function of GPCRs and of GPCR heteromers. As σ_1R may form heteromers with corticotropin releasing factor CRF₁ receptor (Navarro et al., 2015), the occurrence of σ_1R -containing heteroreceptor complexes and the effect of amphetamine on orexin-CRF heteromeric-mediated signaling was also approached using *in vitro* experiments.

RESULTS

Orexin-1 receptors form heteromeric complexes with CRF-2 receptors in a heterologous expression system

To determine if orexin receptor 1 (OX₁R) colocalized at the plasma membrane level with corticotropin releasing factor 2 receptor (CRF₂R), immunocytochemistry assays were undertaken in HEK-293T cells transfected with 0.75 µg cDNA for CRF₂R-YFP, 0.4 µg cDNA for OX₁R-Rluc or both. CRF₂R expression was detected by the YFP own fluorescence while OX₁R expression was detected by a specific antibody against Rluc (1/100) followed by a secondary Cy3-antibody. OX₁R showed a membrane localization and CRF₂R was localized at the plasma membrane but also in intracellular structures (Fig 1A). Colocalization of both receptors was marked (detected in yellow in Fig 1).

Immunocytochemistry assays can show the cell colocalization of two different proteins, they however do not demonstrate physical interactions. Thus, bioluminescence energy transfer (BRET) assays were developed in HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc and increasing amounts of CRF₂R-YFP. The saturation BRET curve shown in Fig 1B indicates a specific interaction between CRF₂R and OX₁R (BRET_{max} 46±3 mBU, BRET₅₀ 33±6) (Fig 1B). As negative control, HEK-293T cells were transfected with the cDNA for GHS-R1a-RLuc (0.75 µg cDNA) and increasing amounts of the cDNA for CRF₂R-YFP (0.1 to 1.2 µg cDNA) and an unspecific linear signal was obtained.

Functional characterization of CRF₂R-OX₁R heteromeric complexes

It is well established that GPCR heteroreceptor complexes display unique properties than differ from those of the individual receptors. To characterize the heteromer-specific signaling characteristics, HEK-293T cells coexpressing CRF₂R and OX₁R were treated with the specific antagonist for CRF₂R, K41498 (1 µM), the specific antagonist for OX₁R, SB334867 (1 µM) or vehicle, followed by activation of receptors with CRF (100 nM) and/or orexin A (100 nM). Four different techniques were used to address signal transduction. In cAMP determination assays we observed the Gs-coupling of CRF₂R and CRF treatment induced a significant increase in cAMP levels. Orexin A decreased 0.5 µM forskolin-induced cAMP levels, thus agreeing with the G_{αi}-coupling of OX₁R (Fig 2A). Interestingly, coactivation with CRF and orexin A induced a similar signal than that obtained with CRF, indicating that CRF₂R engagement blocks OX₁R signaling in the CRF₂R-OX₁R complex. When cells were pretreated with K41498, the antagonist CRF₂R, both a complete inhibition of the CRF effect and partial blockade of the orexin A effect were observed. Such cross-antagonism may be used as fingerprint to detect the CRF₂R-OX₁R complexes in natural sources. The pretreatment with the antagonist of OX₁R, SB334867, also offered a partial cross-antagonism when cells were stimulated with CRF (Fig 2A). In the analysis of calcium mobilization, CRF induced no effect whereas orexin A produced a transient response with a maximum of cytosolic calcium concentration at 30 seconds after ligand addition. Interestingly, coactivation with both ligands completely blocked orexin A-induced effects as it occurred when cAMP signaling was determined. Moreover, cross-antagonism was found; in fact, not only SB334867 but also K41498 inhibited the effect of orexin A (Fig 2B). In ERK1/2 phosphorylation and label-free assays, the effect of either CRF or orexin A was significantly higher than that obtained when cells coactivated using the two agonists simultaneously. The results reflect allosteric interactions within the heteromer that impair signaling when the two protomers are activated

simultaneously. Once more, a cross-antagonism phenomenon was detected as shown by the effect of antagonists displayed in Fig 2C,D. Taken together, the functional characterization of the CRF₂R-OX₁R complex results in the finding of a cross-antagonism in all signal transduction signals analyzed and an allostery-driven negative cross-talk as activation by CRF blocks the effect of Orexin A.

Amphetamine potentiates CRF₂ and OX₁ receptor signaling in an heterologous expression system.

As indicated in Introduction, amphetamine alters the corticotropin releasing factor biology. As the sensation of hunger is also suppressed, we were interested in knowing whether the drug of abuse could affect CRF₂-OX₁ receptor heteromer-mediated signaling. The effect of amphetamine was first assayed in HEK-293T cells transfected with the cDNA (0.6 µg) for CRF₂R. Cells then were pretreated for 30 min with amphetamine (2 µM) (white bars) or vehicle (black bars) and activated using CRF (100 nM). The increase in cAMP levels (around 290%) was further enhanced by the drug (390%). Due to the lack of OX₁R expression, coactivation with CRF and orexin A provided in both conditions, with and without amphetamine, similar results as with CRF (Fig 3A). In OX₁R-expressing HEK-293T cells orexin A led to a reduction in the forskolin-induced cAMP levels (24% reduction). Reduction was potentiated (to 48%) when 2 µM amphetamine was added (Fig 3B). Interestingly, similar results were obtained when CRF₁R or OX₁R expressing cells (0.6 µg cDNA each) were analyzed by DMR assay (Fig 3 C, D), detecting a significant increase in agonist induced changes in cellular density when cells were pretreated with amphetamine (2 µM) for 30 min. When calcium mobilization was analyzed CRF induced no effect in CRF₂R expressing cells due to CRF₂R coupling to a Gs protein (Fig 3E). However, in HEK-293T cells expressing OX₁R, orexin A produced a characteristic pick of calcium release that was increased with amphetamine (2 µM) pretreatment. These results agree with that observed in cAMP and DMR signals, indicating that amphetamine pretreatment potentiates both CRF₂R and OX₁R G protein dependent signaling pathways. Finally, the MAPK phosphorylation assays showed that activation of CRF₂R with 100 nM CRF in cells not expressing the orexin receptor induced an increase of 200% in the levels of ERK1/2 phosphorylation that was not affected by amphetamine pretreatment (Fig 3G). In contrast, when HEK-293T cells expressing OX₁R were treated with 100 nM orexin A, the increase of ERK1/2 phosphorylation (around 420%) was significantly reduced (to 180%) upon 2 µM amphetamine pretreatment (Fig 3H). These results indicate that amphetamine produces a biased effect over CRF₂R and OX₁R that positively impacts on G protein dependent signaling pathways.

Amphetamine effects over CRF₂R depend on expression of σ₁R

Corticotropin releasing factor family is formed by two different receptors, CRF₁R and CRF₂R. We have recently reported (Navarro et al., 2015) the physical interaction between CRF₁R and σ₁R, demonstrating a new mechanism for cocaine-mediated effects through CRF₁R receptors. It has also been reported (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005) that different drugs of abuse, cocaine and metamphetamine among them, may bind to σ₁R. Accordingly, we wondered whether the amphetamine modulation of CRF₂R action could be mediated by σ₁R. First, HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.3 µg) for σ₁R-RLuc and increasing amounts of cDNA for CRF₂R-YFP (0.1 to 1.5 µg). A positive and saturable BRET curve, indicative of dimer formation, was obtained (Fig 4A). We subsequently addressed the potential of σ₁R to mediate the effect of amphetamine on CRF₂R by using silencing σ₁R expression using siRNA approach. Importantly, we used

HEK-293T cells expressing CRF₂R with (Fig 4D) or without the siRNA (Fig 4C) to determine cAMP levels in cells pretreated for 30 min with vehicle (black bars) or with (white bars) 2 μ M amphetamine. The results showed that cells with silenced σ_1 R, did not exhibit the amphetamine-modulating effect. It is assumed that amphetamine potentiation of CRF-induced cAMP signaling was due to the physical interaction between CRF₂R and σ_1 R (Fig 4D).

Amphetamine effects over OX₁R depend on expression of σ_2 R

It is known that OX₁R are not able to physically interact with σ_1 R (Navarro et al., 2015). Thus, it is difficult to understand how amphetamine could modulate orexin A effects. It has been reported (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005) that different drugs of abuse may bind to σ_2 R, as in the case of σ_1 R. To demonstrate if amphetamine effects over OX₁R could be due to the formation of a σ_2 R-OX₁R complex, HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc (0.35 μ g) and increasing amounts of σ_2 R-YFP (0.05 to 0.4 μ g) were assayed for BRET. A specific interaction between σ_2 R and OX₁R receptors was deduced from the saturable BRET curve (Fig 4B). Similar results were obtained in untreated (black line) and treated with 2 μ M amphetamine (red line) cells (BRET_{max} 21.05 \pm 3.59, BRET₅₀ 42.61 \pm 14.39 and BRET_{max} 33.18 \pm 8.96, BRET₅₀ 43.49 \pm 24.79, respectively). Functional studies were then developed in HEK-293T cells expressing OX₁R and endogenous σ_2 R (Fig 4C) or in similar cells in which the expressing of σ_2 R was silenced by specific siRNA (Fig 4E). Amphetamine (2 μ M) pretreatment only modulated orexin A action when σ_2 R was expressed. In summary, amphetamine potentiation of orexin A induced cAMP signaling seemed due to the physical interaction between OX₁R and σ_2 R (Fig 4D).

Amphetamine potentiates the negative cross-talk displayed by the OX₁R-CRF₂R heteromer

We next moved to test the effect of the drug of abuse on the GPCR heteromer mediated signaling. Immunocytochemistry assays were performed in a heterologous expression system to investigate whether amphetamine could affect the expression of OX₁R-CRF₂R heteromers. Whereas OX₁R was expressed at the plasma membrane level with no major changes in cells pretreated with amphetamine, CRF₂R, which in the absence of amphetamine showed a main intracellular expression, increased surface expression in cells treated with the drug. Moreover, colocalization between CRF₂R and OX₁R at the plasma membrane level increased (Fig 5A). To analyze the amphetamine effect over CRF₂R-OX₁R heteromeric complexes, a BRET assay was performed in cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc and increasing amounts of CRF₂R-YFP. Similar results were obtained in untreated (black line) and treated with 2 μ M amphetamine (red line) cells (BRET_{max} 55.94 \pm 2.59, BRET₅₀ 9.59 \pm 1.45 and BRET_{max} 62.53 \pm 4.19, BRET₅₀ 10.59 \pm 2.25, respectively) (Fig 5B). These results indicate that amphetamine do not alter the physical interaction between CRF₂R and OX₁R in the heteromeric complex. Finally, to assess any effect of amphetamine over the CRF₂R-OX₁R complex, cAMP, ERK1/2 phosphorylation, calcium mobilization and label-free assays were performed in cotransfected cells pretreated with 2 μ M amphetamine and with receptor antagonists (1 μ M K41498 or 1 μ M SB334867) or vehicle treatment. Finally, receptors were activated using CRF (100 nM) and/or orexin A (100 nM). It was observed that amphetamine potentiated both CRF and orexin A signals. Remarkably, the negative cross-talk observed in the absence of amphetamine, was not only maintained in the presence of the drug but it was potentiated. Moreover, the cross-antagonism phenomenon described in Figure 2 also

appeared when amphetamine was added at HEK-293T cells coexpressing CRF₂R and OX₁R. Altogether, it can be concluded that amphetamine addition exacerbates CRF₂R-OX₁R heteromeric-mediated signaling.

Microdialysis experiments showed that amphetamine potentiates orexin A induced dopamine and glutamate release

The ability of amphetamine to modulate the OX₁R function was addressed in a more physiological setup, namely under physiological conditions in *in vivo* microdialysis experiments. In Figure 6A it is shown the typical placement of the microdialysis probe in the VTA, at 5.2 mm posterior to bregma. As it can be seen in Fig. 6B, in amphetamine-treated rats, infusion of orexin-A (10 μM) for 20 min to VTA produced an increase in extracellular dopamine and glutamate release compared to saline-control rats. These data agree with that obtained in HEK-293T cells indicating that amphetamine treatment potentiates OX₁R function. The increase of both extracellular dopamine and glutamate levels was counteracted by a previous VTA infusion of the CRF₂R selective antagonist K41498 (1 μM), demonstrating the negative cross-antagonism (Fig. 6C) previously described in HEK-293T cells expressing both receptors.

DISCUSSION

The results here presented identify a novel interaction, namely the formation of OX₁R and CRF₂R heteroreceptor complexes in both heterologous expression systems and natural sources. Some specific properties of the heteroreceptor complex that are mediated by allosteric interactions within the receptor protomers in the OX₁R-CRF₂R heteromeric complex were i) a blockade by CRF of OX₁R signaling and ii) a cross-antagonism, which is instrumental to detect the heteromers in natural sources. A review on the uniqueness of GPCR heteromers as example of the ability of antagonists of one protomer to antagonize the signaling of another protomer in an heteroreceptor complex is provided in Ferré et al., (2014). The negative modulation of the effect of orexin A by CRF suggests that some of the effects of orexin A on the HPA (Spinazzi et al., 2006; Steiner et al., 2013) occur at the level of receptors forming heteromers in brain cells. Our results also constitute an underlying framework to address therapeutic approaches to combat stress-related psychiatric disorders in which the hypocretin/orexin system has a relevant role (reviewed in James et al., 2017). It should be noted that the expression of the orexin receptor has been characterized in cells of the HPA axis (Czerwinska et al., 2017). We also demonstrate that amphetamine modulates both OX₁R and CRF₂R-mediated signaling and that the effect of the drug was mediated by sigma receptors forming heteromers with OX₁R and CRF₂R.

The two sigma receptors that are described to date are: the non-opioid receptor, σ₁R, and the PGRMC-1 protein, also known as σ₂R. Despite the endogenous ligands are not known, the two sigma receptors may bind drugs of abuse. Recent studies have demonstrated that σ₁R is involved in the modulation by drugs of abuse of GPCR signaling. Although its role as true receptor is not demonstrated, synthetic agonists and antagonists are available for σ₁R. PRE-084 is considered a selective agonist due to its ability to dose-dependently dissociate σ₁R from a binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein (BiP/GPR-78) (Hayashi and Su, 2007). Despite not having a specific signaling machinery, once activated by an agonist, σ₁R operate via translocation to the plasma membrane and via protein-protein-mediated modulation of cell responses (Su et al., 2016) involving calcium

signaling and ion channels (Wu and Bowen, 2008). Of special interest here is the regulation of GPCR functionality. Kruse (2016) has recently reviewed the intriguing features of σ_1 R, with no structural resemblance with any other membrane receptor, occluded ligand binding site, and resemblance to a yeast enzyme, yeast sterol isomerase. Remarkably, while the physiological function remains elusive and the endogenous ligand is yet to be discovered, σ_1 R binds cocaine and metamphetamine and it mediates some effects of the drugs (Lever et al., 2016; McCracken et al., 1999; Nguyen et al., 2005; Skuza, 1999). The design of drugs impeding the interaction of cocaine with σ_1 R is proposed to reduce drug-seeking behavior (Matsumoto et al., 2001). Formation of heteroreceptor complexes with GPCR has been previously demonstrated. In fact, cocaine binds to σ_1 receptors and due to a receptor-receptor direct interaction modulates the function of dopamine D₁ (Navarro et al., 2010) (Moreno et al., 2014) and D₂ receptors (Navarro et al., 2013) and corticotropin releasing factor CRF₁ receptor (Navarro et al., 2015). Similar studies on σ_2 R-mediated interaction with GPCRs and modulation of GPCR signaling were lacking despite *in vitro* evidence of σ_2 R involvement in amphetamine effect on dopamine transport (Izenwasser et al., 1998; Weatherspoon and Werling, 1999) and despite treatment with σ_2 R antagonists is capable of counteracting cocaine-induced locomotor stimulation in mice (Guo and Zhen, 2015; Lever et al., 2014). Remarkably, we here report that the effect of amphetamine on CRF₂R was mediated by σ_1 R, whereas the effect of the drug on OX₁R was instead mediated by σ_2 R. Although direct studies with amphetamine have not been reported, it is known that methamphetamine may bind to both sigma receptors although with more affinity to the σ_1 R (Nguyen et al., 2005).

Finally, our results suggest that σ_2 R may, at least partially, mediate the hunger-suppressive action of amphetamine by interacting with orexigenic receptors in CRF₂R-OX₁R heteromer contexts. Detection of heteromers by cross-antagonism in microdialysis assays shows the real relevance of this possibility. To our knowledge, this is the first report showing *in vivo* GPCR heteromer identification by cross-antagonism. This is a novel approach to add to the few that allow identification of GPCR heteromers in natural sources (Franco et al., 2016).

REFERENCES

- Aston-Jones, G., Smith, R.J., Sartor, G.C., Moorman, D.E., Massi, L., Tahsili-Fahadan, P., and Richardson, K.A. (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res.* 1314, 74–90.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., and Chrousos, G.P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245–261.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
- Cobos, E., Entrena, J., Nieto, F., Cendán, C., and Del Pozo, E. (2008). Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma1 Receptor Ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366.

- Corbera, J., Vaño, D., Martínez, D., Vela, J.M., Zamanillo, D., Dordal, A., Andreu, F., Hernandez, E., Perez, R., Escriche, M., et al. (2006). A Medicinal-Chemistry-Guided Approach to Selective and Druglike Sigma 1 Ligands. *ChemMedChem* 1, 140–154.
- Czerwinska, J., Chojnowska, K., Kaminski, T., Bogacka, I., Smolinska, N., and Kaminska, B. (2017). Orexin receptor expression in the hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes of free-living European beavers (*Castor fiber* L.) in different periods of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 240, 103–113.
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* 66, 413–434.
- Franco, R., Martínez-Pinilla, E., Lanciego, J.L.J.L., and Navarro, G. (2016). Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Front Pharmacol* *In press*, 76.
- Gallagher, J.P., Orozco-Cabal, L.F., Liu, J., and Shinnick-Gallagher, P. (2008). Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 215–225.
- Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J.T., Eisch, A.J., Yanagisawa, M., Nestler, E.J., and DiLeone, R.J. (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3106–3111.
- Guo, L., and Zhen, X. (2015). Sigma-2 receptor ligands: neurobiological effects. *Curr. Med. Chem.* 22, 989–1003.
- Harris, G.C., Wimmer, M., and Aston-Jones, G. (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556–559.
- Hayashi, T., and Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610.
- Izenwasser, S., Thompson-Montgomery, D., Deben, S.E., Chowdhury, I.N., and Werling, L.L. (1998). Modulation of amphetamine-stimulated (transporter mediated) dopamine release in vitro by sigma2 receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 346, 189–196.
- James, M.H., Campbell, E.J., and Dayas, C.V. (2017). Role of the Orexin/Hypocretin System in Stress-Related Psychiatric Disorders. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*
- Kruse, A. (2016). Structural Insights into Sigma1 Function. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, p.
- Lever, J.R., Miller, D.K., Green, C.L., Ferguson-Cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Fan, K.-H., and Lever, S.Z. (2014). A selective sigma-2 receptor ligand antagonizes cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Synap. N. Y. N* 68, 73–84.
- Lever, J.R., Ferguson-Cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Lord, S.A., Xu, R., Miller, D.K., and Lever, S.Z. (2016). Cocaine occupancy of sigma₁ receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse* 70, 98–111.

- Matsumoto, R.R., Hewett, K.L., Pouw, B., Bowen, W.D., Husbands, S.M., Cao, J.J., and Newman, A.H. (2001). Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: Correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology* *41*, 878–886.
- McCracken, K.A., Bowen, W.D., and Matsumoto, R.R. (1999). Novel sigma receptor ligands attenuate the locomotor stimulatory effects of cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* *365*, 35–38.
- Mei, J., and Pasternak, G.W. (2002). Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *300*, 1070–1074.
- Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine Disrupts Histamine H3 Receptor Modulation of Dopamine D1 Receptor Signaling: σ 1-D1-H3 Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 3545–3558.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., and Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* *26*, 235–269.
- Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortes, A., Casado, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18676–18681.
- Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., et al. (2013). Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* *8*, e61245.
- Navarro, G., Quiroz, C., Moreno-Delgado, D., Sierakowiak, A., McDowell, K., Moreno, E., Rea, W., Cai, N.-S., Aguinaga, D., Howell, L.A., et al. (2015). Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *35*, 6639–6653.
- Nguyen, E.C., McCracken, K.A., Liu, Y., Pouw, B., and Matsumoto, R.R. (2005). Involvement of sigma (sigma) receptors in the acute actions of methamphetamine: receptor binding and behavioral studies. *Neuropharmacology* *49*, 638–645.
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., and Kruse, A.C. (2016). Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature* *532*, 527–530.
- Skuza, G. (1999). Effect of sigma ligands on the cocaine-induced convulsions in mice. *Pol. J. Pharmacol.* *51*, 477–483.
- Sotomayor, R., Forray, M.I., and Gysling, K. (2005). Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J. Neurosci. Res.* *81*, 132–139.
- Sotomayor-Zárate, R., Araya, K.A., Pereira, P., Blanco, E., Quiroz, G., Pozo, S., Carreño, P., Andrés, M.E., Forray, M.I., and Gysling, K. (2010). Activation of GABA-B receptors

induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *J. Neurochem.* *114*, 1678–1686.

Spinazzi, R., Andreis, P.G., Rossi, G.P., and Nussdorfer, G.G. (2006). Orexins in the Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Pharmacol. Rev.* *58*, 46–57.

Steiner, M.A., Sciarretta, C., Brisbare-Roch, C., Strasser, D.S., Studer, R., and Jenck, F. (2013). Examining the role of endogenous orexins in hypothalamus–pituitary–adrenal axis endocrine function using transient dual orexin receptor antagonism in the rat. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 560–571.

Su, T.P., Su, T.C., Nakamura, Y., and Tsai, S.Y. (2016). The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol. Sci.* *37*, 262–278.

Sun, H., Shi, M., Zhang, W., Zheng, Y.-M., Xu, Y.-Z., Shi, J.-J., Liu, T., Gunosewoyo, H., Pang, T., Gao, Z.-B., et al. (2016). Development of Novel Alkoxyisoxazoles as Sigma-1 Receptor Antagonists with Antinociceptive Efficacy. *J. Med. Chem.* *59*, 6329–6343.

Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., and Lombès, M. (2007). The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* *5*, e012.

Weatherspoon, J.K., and Werling, L.L. (1999). Modulation of amphetamine-stimulated [³H]dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells by sigma type 2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 278–284.

Wu, Z., and Bowen, W.D. (2008). Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 28198–28215.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Orexin-A, CRF, SB334867 and K41498 were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). DL-Amphetamine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). For the microdialysis experiments, amphetamine sulphate was donated by Laboratorio Chile S.A (Núñoa, Santiago, Chile).

Cell Lines

HEK-293T cells were grown in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Halethorpe, MD) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin/streptomycin, minimum Eagle's medium non-essential amino acid solution (1/100) and 5% (v/v) heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Expression Vectors and Fusion Proteins

Human cDNAs for CRF₂ receptor, OX₁ receptor, σ₁ receptor, σ₂ receptor GHS-R1a and A_{2A}, cloned into pcDNA3.1, were amplified without their stop codons using sense and

antisense primers harboring the following: EcoRI and KpnI sites to clone OX₁ receptor and σ_2 receptor in the pcDNA3.1RLuc vector (pRLuc-N1, PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) and to clone CRF₂ receptor and GHS-R1a in the pEYFP-N1 vector (enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany); HindIII and BamHI sites to clone σ_1 R in pEYFP-N1 vector; EcoRI and BamHI sites to clone A_{2A} receptor in pEYFP-N1 vector. Amplified fragments were subcloned to be in-frame with restriction sites of pRLuc-N1 or pEYFP-N1 vectors to provide plasmids that express proteins fused to RLuc or YFP on the C-terminal end (OX₁-RLuc, CRF₂-YFP, GHS-R1a-YFP, A_{2A}-YFP, σ_1 R-RLuc and σ_2 R-RLuc).

Cell Transfection

HEK-293T cells growing in 6-well dishes were transiently transfected with the corresponding protein cDNA by the PEI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) method. Cells were incubated with the corresponding cDNA together with PEI (5.47 mM in nitrogen residues) and 150 mM NaCl in a serum-starved medium. After 4 h, the medium was changed to a fresh complete culture medium. Cells were maintained at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

Resonance Energy Transfer-based Assays

For BRET assays, HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant cDNA encoding for receptor-RLuc and with increasing amounts of cDNA corresponding to receptor-YFP. 24 h after transfection, cells were adjusted to 20 μ g of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin for standardization. To quantify fluorescence proteins, cells were distributed in 96-well black microplates with a transparent bottom (Corning 3600, Corning, NY), and the fluorescence was read in a Fluostar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp using a 10 nm bandwidth excitation filter at 485 nm for receptor-YFP reading. Receptor fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing receptor-RLuc alone. For BRET measurements, cells were distributed in 96-well white microplates with white bottoms (Corning) and 5 μ M of coelenterazina-H (Molecular Probes, Eugene, OR) were added. One minute after adding coelenterazine-H, BRET was determined using a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. To quantify protein-RLuc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5 μ M coelenterazine-H addition using a Mithras LB 940. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf, where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the donor construct expressed alone in the same experiment. GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA) was used to fit data. BRET is expressed as mili BRET units, mBU (net BRET x 1,000).

Immunocytochemistry

Transiently transfected HEK-293T cells were incubated 30 minutes with vehicle or 2 μ M amphetamine and immediately, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed twice with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. After permeabilization with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were treated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, cells expressing receptor-RLuc were labeled with a primary mouse

monoclonal anti-RLuc antibody (1/100, EMD Millipore, Darmstadt, Germany) for 1 h, washed, and stained with a secondary antibody for Cy3 donkey anti-mouse (1/100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD). Receptors fused to YFP were detected by their fluorescent properties. Cell nuclei were stained with Hoescht (Sigma-Aldrich). Samples were washed, mounted with 30% Mowiol (Calbiochem) and observed under a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Scale bar: 20 μm .

Dynamic mass redistribution assays (DMR)

Cell mass redistribution induced upon receptor activation were detected by illuminating the underside of a biosensor with polychromatic light and measuring the changes in the wavelength of the reflected monochromatic light that is a sensitive function of the index of refraction. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) is directly proportional to the amount of DMR. HEK-293T cells were seeded in 384-well sensor microplates to obtain 70-80% confluent monolayers constituted by approximately 10,000 cells per well. Previous to the assay, cells were washed twice with assay buffer (HBSS with 20 mM HEPES, pH 7.15) and incubated 2 h with assay-buffer (24°C, 30 μl /well). Hereafter, the sensor plate was scanned and a baseline optical signature was recorded for 10 min before adding 10 μl of amphetamine or the specific antagonists and agonists; all test compounds were dissolved in assay buffer. The cell signaling signature was determined using an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer) by a label-free technology. Then, DMR responses were monitored for at least 4,000 s. Results were analyzed using EnSpire Workstation Software v 4.10.

Intracellular Calcium Release

Cells were co-transfected with the cDNA for the indicated receptors and 0.75 μg of GCaMP6 calcium sensor (Chen et al., 2013) using the PEI method. 24h after transfection, 150,000 cells/well in 96-well black, clear-bottom microtiter plates were incubated with Mg^{+2} -free Locke's buffer (pH 7.4) (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO_3 , 2.3 mM CaCl_2 , 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 μM glycine, and receptor ligands were added as indicated. The fluorescence emission intensity of GCaMP6 was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on the EnSpire® multimode plate reader for 335 s every 15 s and 100 flashes/well.

cAMP Accumulation

Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer assays were performed using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer Life Sciences). The optimal cell density was first established for an appropriate fluorescent signal by measuring the time-resolved FRET signal as a function of forskolin concentration using different cell densities. Forskolin dose-response curves were related to the cAMP standard curve to establish which cell density provides a response that covers most of the dynamic range of the cAMP standard curve. Cells growing in medium containing 50 μM zardeverine were pretreated with vehicle or 2 μM amphetamine for 30 minutes at 25°C. Then, 3000 HEK-293T cells/well in 384-well microplates were treated with the antagonists or the corresponding vehicle for 20 min and stimulated with agonists for 15 min before adding 0.5 μM forskolin or vehicle and incubating for an additional 15-min period. Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with a homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer optical module (BMG Labtech).

Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 200-230 g were selected for the experiments. They were kept in a controlled environment with a 12-h light-dark cycle and at 21 °C room temperature. Food and water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of Faculty of Biological Sciences of “Pontificia Universidad Católica de Chile” and follow the international guidelines (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Experimental procedure

Animals keep housing and handling in colony for 3 days once of arrived and then were divided randomly into two groups that received injection of either AMPH (1.5 mg/kg, i.p) or an equivalent volume of saline solution once per day. The procedure was carried out at 10:00-11:00 AM, once a day for a five consecutive days. After 5 days of abstinence, microdialysis experiment was performed.

Microdialysis and analysis of samples

The animals were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p). Body temperature of the animals was maintained at 37°C with an electrical blanket controlled by a thermostat. A quarter of the initial dose of chloral hydrate was given every hour to maintain the animal anesthetized during the course of the experiments. Concentric brain microdialysis probes, 2 mm in length (CMA 12, CMA Microdialysis AB, Solna, Sweden) were implanted in the VTA. The coordinates used, according to the atlas of Paxinos and Watson (1986), were: VTA: antero-posterior (AP): -5.2 mm, medial-lateral (ML) 0.7 mm and dorso-ventral (DV) -8.7 mm. Microdialysis probes were perfused with Krebs-Ringer's phosphate buffer with 0.02% BSA (KRP-BSA) at a rate of 2 μ L/min using a Harvard infusion pump (Model 22; Dover, MA, USA). After a 90 min stabilization period, 10 min samples were collected in 4 μ L of 0.2 M perchloric acid. K411498 (1 μ M) and orexina A (10 μ M) were added intra-VTA in the perfusion media as indicated in the respective figures. At the end of each experiment, animals were killed by decapitation and brains quickly removed and stored in formalin. Brain coronal sections of 30 μ m were stained with Cresyl violet to verify probe location under microscope.

HPLC-electrochemical determination of DA was performed as previously described (Sotomayor et al., 2005). The retention time for DA was 11.0 min and the detection limit was 0,1fmol/ μ L. HPLC-fluorometric determination of Glu and GABA was performed as previously described (Sotomayor-Zárate et al., 2010). The retention time for Glu and GABA was 2.8 and 14.0 min, respectively, and the detection limit for GABA and Glu was 5 fmol/ μ L).

Figure 1

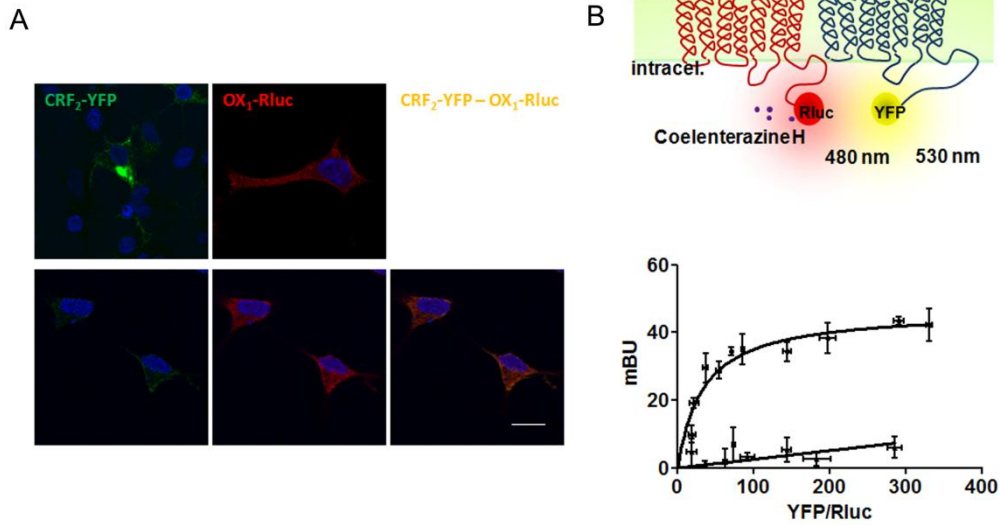


Figure 1. Corticotropin releasing factor CRF₂ receptor forms heteromeric complexes with orexin OX₁ receptor. Panel A: HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂-YFP, 0.4 μ g cDNA for OX₁-RLuc or both were identified by YFP fluorescence (green) or a monoclonal anti-RLuc (1/100) primary antibody and a cyanine-3-conjugated (1/200) secondary antibody (red). Colocalization of both receptors is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (1/100, blue). Scale bar 20 μ m. Panel B: BRET was performed in HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc (0.4 μ g cDNA) (or GHS-R_{1a}-RLuc -0.75 μ g cDNA- as negative control) and increasing amounts of CRF₂R-YFP (0.1 to 1.2 μ g cDNA) (Fig 1B). Values are \pm SEM of 5 to 6 different experiments. A schematic representation of the assay is shown (top).

Figure 2

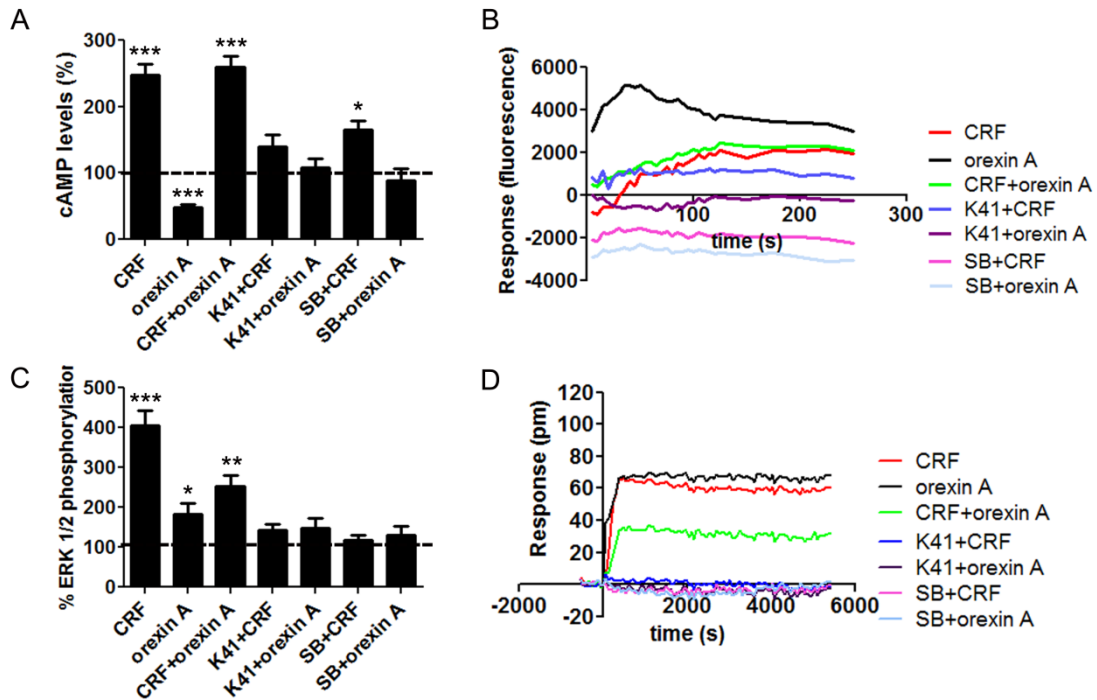


Figure 2. Functional characterization of CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex. HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA for CRF₂ receptor and with 0.6 μ g cDNA for OX₁ receptor were pretreated with the CRF₂ receptor antagonist, K41498 (1 μ M) or the OX₁ receptor antagonist SB334687 (1 μ M) followed by treatment with CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or both. cAMP levels (A), calcium release (B), ERK1/2 phosphorylation (C) and DMR (D) data were collected. In panels A and C data are represented in percentage over basal (100% represented by a dotted line). Values are the mean \pm SEM of 5 to 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal conditions (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Figure 3

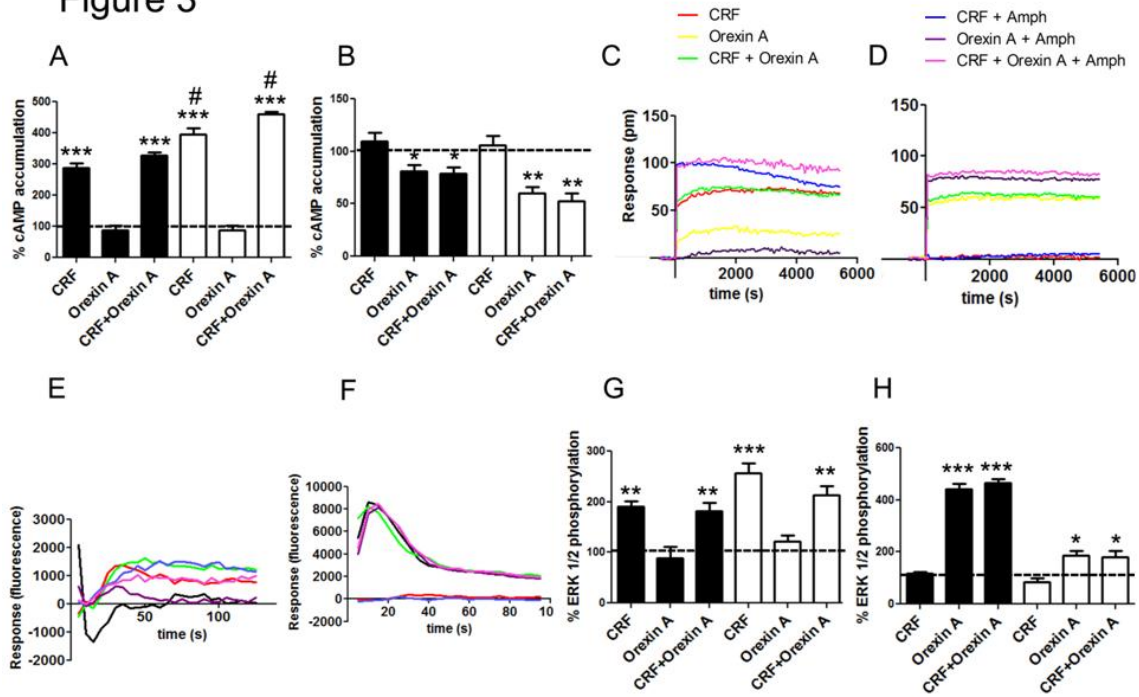


Figure 3. Amphetamine potentiates both, orexin- and CRF-induced signaling. HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂ receptor (A, C, E, G) or with 1 μ g cDNA for OX₁ receptor (B, D, F, H) were pretreated with 2 μ M amphetamine (white bars) or vehicle (black bars) for 30 min prior to CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or combined treatments. cAMP levels (A-B), calcium release (C-D), DMR (E-F) and ERK1/2 phosphorylation (G-H) data were collected. Data in the plot are given in percentage over basal (or over forskolin in the case of cAMP assays using orexin A); 100% is represented by a dotted line. Values are the mean \pm SEM of 5 to 7 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (or over forskolin in the case of cAMP assays using orexin A) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Figure 4

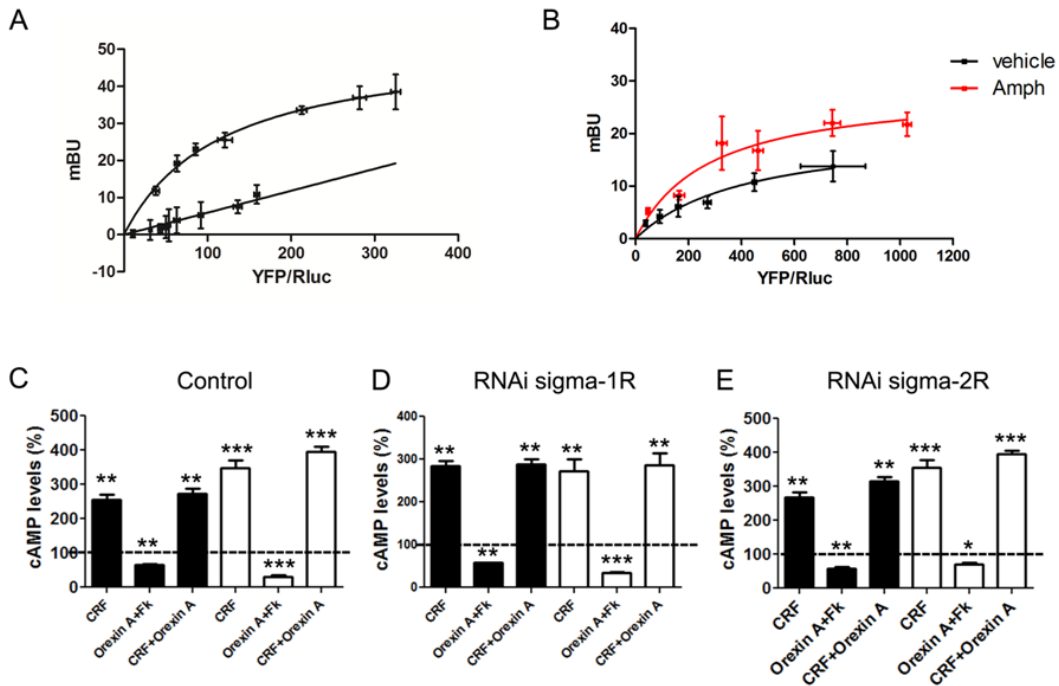


Figure 4. CRF₂ receptors interact with sigma-1R and OX₁ receptors interact with sigma-2R. Panel A: HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.3 μ g) for sigma-1R-RLuc and with increasing amounts of cDNA for CRF₂R-YFP (0.1 to 1.5 μ g) or A_{2A}-YFP (0.05 to 0.3 μ g) as a negative control. Values are the mean \pm SEM of 4 to 6 different experiments. Panel B: HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.35 μ g) for OX₁R-RLuc and with increasing amounts of cDNA for sigma-2R-YFP (0.05 to 0.4 μ g). Cells were treated with 2 μ M amphetamine (red line) or vehicle (black line) for 30 min and energy transfer assays were undertaken. Values are the mean \pm SEM of 5 to 7 different experiments. Panels C-E: HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA for CRF₂ receptor and with 0.6 μ g cDNA for OX₁ receptor in the absence (C) or presence of RNAi for sigma-1R (D) or for sigma-2R (E) were pretreated with 2 μ M amphetamine (white bars) or vehicle (black bars) for 30 min prior to receptor activation using CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or both. cAMP level determination was performed and data are represented in percentage over basal (100% represented by a dotted line). Values are the \pm SEM of 6 to 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal conditions (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$).

Figure 5

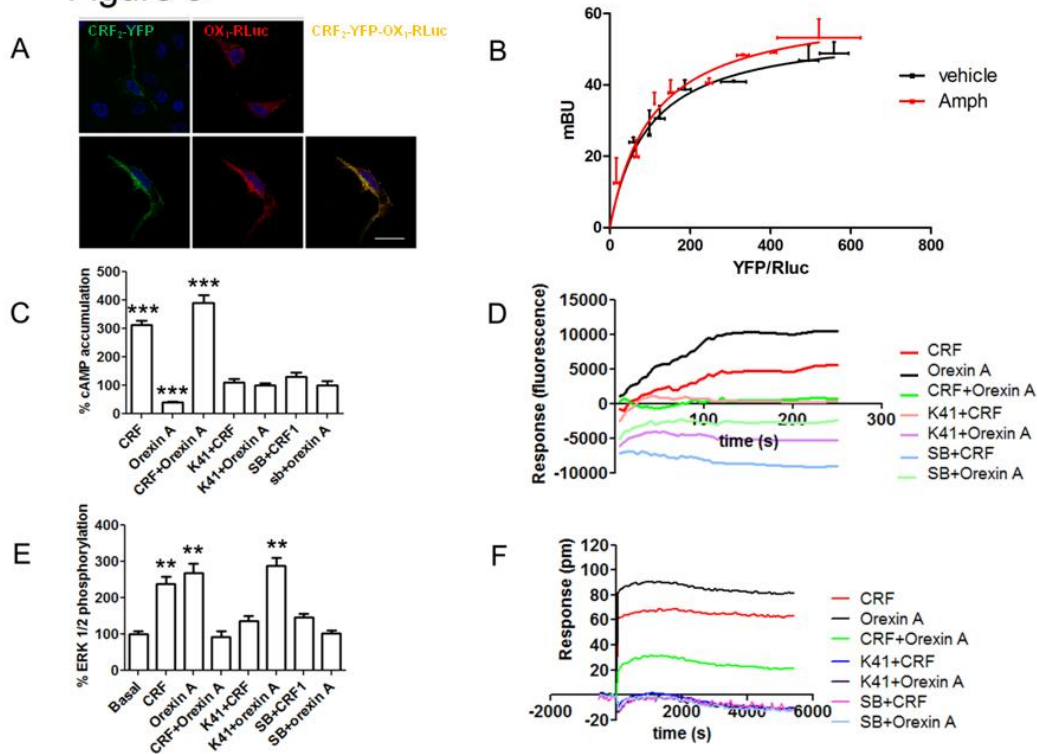


Figure 5. Amphetamine effect over CRF₂-OX₁ heteroreceptor complexes. Panel A: HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂-YFP, 0.4 μ g cDNA for OX₁-RLuc or both were pretreated with 2 μ M amphetamine for 30 min. Receptors were identified by YFP fluorescence (green) or a monoclonal anti-RLuc (1/100) primary antibody and a cyanine-3-conjugated (1/200) secondary antibody (red). Colocalization of the two receptors is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (1/100, blue). Scale bar 20 μ m. Panel B: BRET was performed in HEK-293T cells transfected with a constant amount of cDNA (0.4 μ g) for OX₁R-RLuc and increasing amounts of cDNA (0.2 to 1.5 μ g) for CRF₂R-YFP and treated with 2 μ M amphetamine (red line) or vehicle (black line) for 30 min prior to data recording. Values are the mean \pm SEM of 5 to 7 different experiments. Panels C-F: HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA for CRF₂ receptor and 0.6 μ g cDNA for OX₁ receptor were pretreated with 2 μ M amphetamine (30 min), further treated with the CRF₂ receptor antagonist K41498 (1 μ M) or the OX₁ receptor antagonist SB334687 (1 μ M) and finally with CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or both. cAMP levels (C), calcium release (D), ERK1/2 phosphorylation (E) and DMR (F) data were collected. In panels C and E data are represented in percentage over basal (100% represented by a dotted line). Values are the mean \pm SEM of 6 to 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal conditions (* p < 0.05** p < 0.01*** p < 0.001).

Figure 6

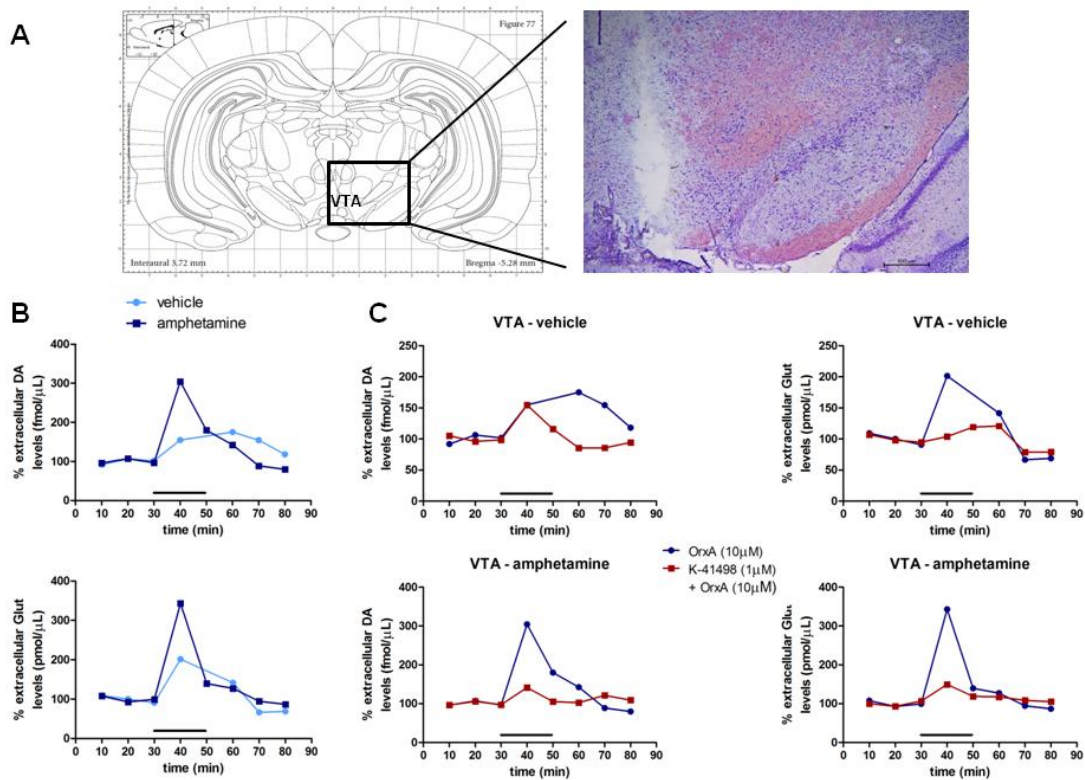


Figure 6. Amphetamine potentiates orexin-induced extracellular glutamate and dopamine release. Panel A: scheme extracted from the rat brain atlas (Paxinos and Watson 1986) and typical placement of a microdialysis probe in the VTA, at 5.2 mm posterior to bregma, 0.7 lateral and 8.7 mm ventral. Panel B: effect of VTA infusion of orexin A (10 μ M) for 20 min (black line) on extracellular dopamine (DA, top) and Glutamate (Glut, bottom) release in saline control rats (light blue) and amphetamine-treated rats (dark blue). Panel C: effect of VTA infusion of orexin A (10 μ M, dark blue) for 20 min (black line) previous treatment with the CRF₂R antagonist K41489 (1 μ M, red) for 20 min on extracellular dopamine (DA) and Glutamate (Glut) release in saline control rats (top) and amphetamine-treated rats (bottom). In panels B and C data are represented in percentage over basal.

3.3. *Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} - cannabinoid CB₁ receptor heteromers in the dorsal striatum.*

Estefanía Moreno, Anna Chiarlone, **Mireia Medrano**, Mar Puigdemívol, Lucka Bibic, Lesley A. Howell, Eva Resel, Nagore Puente, María J. Casarejos, Juan Perucho, Joaquín Botta, Núria Suelves, Francisco Ciruela, Silvia Ginés, Ismael Galve-Roperh, Vicent Casadó, Pedro Grandes, Beat Lutz, Krisztina Monory, Enric I. Canela, Carmen Lluís*, Peter J. McCormick*, Manuel Guzmán*

Artículo publicado en *Neuropsychopharmacology*. 2017 Feb 15. doi: 10.1038/npp.2017.12. [Epub ahead of print]

El estriado dorsal es una región clave en diversos procesos neurobiológicos como la actividad motora, funciones cognitivas y procesos afectivos. El buen funcionamiento de las neuronas estriatales depende de manera crítica de los receptores metabotrópicos. Especialmente, los principales receptores de adenosina y de cannabinoides presentes en el estriado, el receptor de adenosina A_{2A} y el receptor de cannabinoides CB₁, tienen una importancia crucial en el control de la excitabilidad neuronal. Se han descrito interacciones funcionales inhibitoras y facilitadoras entre los receptores estriatales A_{2A} y CB₁, y diversas evidencias sostienen que el *crossstalk* observado depende, al menos en parte, de la formación de heterómeros de receptores A_{2A}-CB₁. Sin embargo, la localización específica y las propiedades de estos complejos siguen siendo desconocidas. En este estudio, mediante técnicas que permiten la visualización precisa de los heterómeros de receptores *in situ* en combinación con sofisticados modelos animales genéticamente modificados, junto con aproximaciones bioquímicas y farmacológicas, proveemos un mapa de expresión de alta resolución así como una caracterización funcional del heterómero de receptores A_{2A}-CB₁ en el estriado dorsal. Específicamente, nuestros datos revelan que el heterómero de receptores (1) se encuentra ausente en las proyecciones cortico-estriatales y en las neuronas estriato-nigrales mientras que está presente en las neuronas estriato-palidales, (2) presenta un sorprendente perfil de señalización acoplado a proteína G, en el que la co-estimulación de ambos receptores resulta en una fuerte reducción de la señalización intracelular, y (3) experimenta una disfunción sin precedentes en la enfermedad de Huntington, enfermedad paradigmática que afecta a las neuronas estriatales. En conjunto, nuestros resultados abren nuevas perspectivas en el entendimiento del papel coordinado de la función adenosinérgica y cannabinérgica en la vía indirecta del estriado, que puede ser relevante en la función motora y en las enfermedades neurodegenerativas.

Singular Location and Signaling Profile of Adenosine A_{2A}-Cannabinoid CB₁ Receptor Heteromers in the Dorsal Striatum

Estefanía Moreno^{1,2}, Anna Chiarlone^{1,3,4}, Mireia Medrano^{1,2}, Mar Puigdemívol⁵, Lucka Bibic⁵, Lesley A Howell^{5,6}, Eva Resel^{1,3,4}, Nagore Puente^{7,8}, María J Casarejos⁴, Juan Perucho⁴, Joaquín Botta⁵, Nuria Suelves^{1,9}, Francisco Ciruela¹⁰, Silvia Ginés^{1,9}, Ismael Galve-Roperh^{1,3,4}, Vicent Casadó^{1,2}, Pedro Grandes^{7,8}, Beat Lutz¹¹, Krisztina Monory¹¹, Enric I Canela^{1,2}, Carmen Lluis^{*,1,2}, Peter J McCormick^{*,1,2,5,12} and Manuel Guzmán^{*,1,3,4}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica and Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Complutense University, Madrid, Spain; ⁴Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain; ⁵School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, UK; ⁶School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary, University of London, London, UK; ⁷Department of Neurosciences, University of the Basque Country UPV/EHU, Leioa, Spain; ⁸Achucarro Basque Center for Neuroscience, Bizkaia Science and Technology Park, Zamudio, Spain; ⁹Biomedical Science Department, School of Medicine; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, and Neuroscience Institute, Barcelona University, Barcelona, Spain; ¹⁰Pharmacology Unit, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, IDIBELL, and Neuroscience Institute, Barcelona University, Barcelona, Spain; ¹¹Institute of Physiological Chemistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany; ¹²Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, Surrey, UK

The dorsal striatum is a key node for many neurobiological processes such as motor activity, cognitive functions, and affective processes. The proper functioning of striatal neurons relies critically on metabotropic receptors. Specifically, the main adenosine and endocannabinoid receptors present in the striatum, ie, adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) and cannabinoid CB₁ receptor (CB₁R), are of pivotal importance in the control of neuronal excitability. Facilitatory and inhibitory functional interactions between striatal A_{2A}R and CB₁R have been reported, and evidence supports that this cross-talk may rely, at least in part, on the formation of A_{2A}R-CB₁R heteromeric complexes. However, the specific location and properties of these heteromers have remained largely unknown. Here, by using techniques that allowed a precise visualization of the heteromers *in situ* in combination with sophisticated genetically modified animal models, together with biochemical and pharmacological approaches, we provide a high-resolution expression map and a detailed functional characterization of A_{2A}R-CB₁R heteromers in the dorsal striatum. Specifically, our data unveil that the A_{2A}R-CB₁R heteromer (i) is essentially absent from corticostriatal projections and striatonigral neurons, and, instead, is largely present in striatopallidal neurons, (ii) displays a striking G protein-coupled signaling profile, where co-stimulation of both receptors leads to strongly reduced downstream signaling, and (iii) undergoes an unprecedented dysfunction in Huntington's disease, an archetypal disease that affects striatal neurons. Altogether, our findings may open a new conceptual framework to understand the role of coordinated adenosine-endocannabinoid signaling in the indirect striatal pathway, which may be relevant in motor function and neurodegenerative diseases.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 15 February 2017; doi:10.1038/npp.2017.12

*Correspondence: Dr C Lluis, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona 08028, Spain, Tel: +34 93 4021208, Fax: +34 93 4021559, E-mail: clluis@ub.edu or Dr PJ McCormick, School of Veterinary Medicine Faculty of Health & Medical Sciences, University of Surrey, Daphne Jackson Road, Guildford, Surrey, GU2 7AL, UK, Tel: +44 (0)1483 684399, Fax: +44 (0)1483 684399, E-mail: p.mccormick@surrey.ac.uk or Professor M Guzmán, Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica (IUIIN) and Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, Madrid 28040, Spain, Tel: +34 91 3944668, Fax: +34 91 3944672, E-mail: mguzman@quim.ucm.es
Received 4 July 2016; revised 13 January 2017; accepted 14 January 2017; accepted article preview online 19 January 2017

INTRODUCTION

The dorsal striatum is a key node for many neurobiological processes such as motor activity, cognitive functions, and affective processes. The vast majority (~95%) of neurons within the striatum are GABAergic medium spiny neurons (MSNs), which receive glutamatergic inputs primarily from the cortex. MSNs differ in their neurochemical composition and form two major efferent pathways, the direct (striatonigral) pathway and the indirect (striatopallidal) pathway (Kreitzer, 2009). The proper functioning of MSNs relies critically on metabotropic receptor signaling. Many neurotransmitters and neuromodulators such as dopamine,

glutamate, endocannabinoids and adenosine control MSN activity and plasticity by engaging their cognate G protein-coupled receptors (GPCRs) (Lovinger, 2010; Girault, 2012). Specifically, the main endocannabinoid and adenosine receptors present in MSNs, ie, cannabinoid type 1 receptor (CB₁R) and adenosine subtype 2A receptor (A_{2A}R), are of pivotal importance in the control of neuronal excitability. CB₁R is one of the most abundant GPCRs in MSNs (Glass *et al*, 2000; Castillo *et al*, 2012). In particular, CB₁R is highly expressed in the terminals of both striatonigral and striatopallidal MSNs, where it mediates endocannabinoid-dependent inhibition of GABA release, thus decreasing motor activity (Katona and Freund, 2008; Castillo *et al*, 2012). CB₁R is also expressed in glutamatergic terminals projecting from the cortex onto the striatum, where it controls MSN function by blunting glutamatergic output and mediating the so-called endocannabinoid-dependent long-term depression (Kreitzer, 2009; Castillo *et al*, 2012). A_{2A}R is also very abundant in the striatum (Schiffmann and Vanderhaeghen, 1993; Schiffmann *et al*, 2007). Presynaptically, a significant fraction of the corticostriatal projections that expresses CB₁R also contains A_{2A}R. These A_{2A}R molecules are mostly located on corticostriatal terminals that form synaptic contacts with striatonigral MSNs (Quiroz *et al*, 2009; Ferreira *et al*, 2015). Blockade of presynaptic A_{2A}R counteracts glutamate release and motor output evoked by cortical stimulation (Quiroz *et al*, 2009; Orru *et al*, 2011; Tebano *et al*, 2012). Postsynaptically, A_{2A}R is selectively located on striatopallidal MSNs, which co-express dopamine D₂ receptor (D₂R) (Schiffmann *et al*, 2007; Azdad *et al*, 2009; Tebano *et al*, 2012). Blockade of postsynaptic A_{2A}R mediates the motor-activating effects of A_{2A}R antagonists, consistent with an inactivation of the indirect pathway (Orru *et al*, 2011; Tebano *et al*, 2012).

The high expression of A_{2A}R and CB₁R in the striatum, together with the key involvement of both receptors in the control of motor and goal-directed behaviors, have led to a large number of studies on the interactions between them (Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012). Understanding these interactions is of special relevance not only physiologically but also pharmacologically as these receptors are targets of widely consumed psychoactive substances such as caffeine (an A_{2A}R antagonist) and Δ⁹-tetrahydrocannabinol (a CB₁R agonist). Both facilitatory and inhibitory functional interactions between striatal A_{2A}R and CB₁R have been demonstrated (Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012; Justinova *et al*, 2014). The precise molecular mechanisms underlying the cross-talk between these receptors is yet to be fully understood, but some evidence supports that they may rely, at least in part, on the formation of A_{2A}R-CB₁R heteromeric complexes (Carriba *et al*, 2007; Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012; Chiodi *et al*, 2016). Despite >10 years of research on GPCR heteromers, there continues to be a major gap in our understanding of where exactly heteromers are expressed as well as linking them to precise signal transduction pathways and biological functions. In the case of the A_{2A}R-CB₁R heteromer, factors to consider include (i) the additional partners with which A_{2A}R and CB₁R could interact differently at presynaptic sites (eg, A₁R) (Ciruela *et al*, 2006) or postsynaptic sites (eg, D₂R and mGluR₅) (Navarro *et al*, 2008; Azdad *et al*, 2009; Cabello *et al*, 2009; Bonaventura *et al*, 2014; Bonaventura *et al*, 2015), (ii) the convergence of adenosine and endocannabinoid actions

on various intracellular signaling pathways (Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012), and (iii) the intricate network of molecular processes controlling adenosine and endocannabinoid release (Kreitzer and Malenka, 2005; Lerner *et al*, 2010).

Previous studies on the A_{2A}R-CB₁R heteromer have relied essentially on energy transfer-based assays in cells ectopically expressing A_{2A}R and CB₁R, as well as co-immunolocalization and co-immunoprecipitation experiments (Carriba *et al*, 2007; Navarro *et al*, 2008; Bonaventura *et al*, 2014). These approaches, although widely exploited and certainly valuable, possess limitations of spatial resolution (co-immunolocalization), molecular specificity (co-immunoprecipitation), and biological interpretation (energy transfer using protein overexpression) to characterize GPCR heteromers. Hence, here we made use of techniques to allow a precise visualization of the heteromers *in situ* in combination with sophisticated genetically modified mouse models, together with biochemical and pharmacological approaches, to cogently characterize the anatomy and signaling profile of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in the dorsal striatum.

MATERIALS AND METHODS

The experimental procedures used in this study are extensively described in Supplementary Materials and Methods. That section provides precise details on animal models (genetic mouse models to study the location of the A_{2A}R-CB₁R heteromer, as well as mouse models of Huntington's disease (HD)), human *post mortem* brain samples (see also Supplementary Table S1), recombinant adeno-associated viral vectors, HIV TAT peptides designed to disrupt the A_{2A}R-CB₁R heteromer, cell culture and transfection procedures, *in situ* proximity ligation assays (PLA), fluorescence complementation assays, dynamic mass redistribution (DMR) label-free assays, cAMP and Ca²⁺ concentration assays, western blotting assays, immunomicroscopy procedures, and statistical analyses (see also Supplementary Table S2).

RESULTS

A_{2A}R-CB₁R Heteromers are Located on GABAergic Neurons Rather Than Glutamatergic Projections in the Mouse Dorsal Striatum

To clarify the precise location of A_{2A}R-CB₁R heteromers in the dorsal striatum we conducted PLA experiments. The PLA assay is a powerful and straightforward technique to detect protein-protein interactions in general, and GPCR oligomers in particular, and to localize these complexes *in situ* with cell sub-population selectivity, thus allowing an unbiased demonstration and quantification of protein complexes in unmodified cells and tissues (Taura *et al*, 2015). Importantly, PLA permits assessing close proximity between proteins within an oligomer with high resolution (<40 nm). As PLA relies on the amplification of a small signal, its main limitation is antibody specificity/background noise, which we minimize by adapting refined technical protocols as well as employing multiple genetic mouse models and controls (Taura *et al*, 2015). Here, we first used conditional mutant mice bearing a genetic deletion of CB₁R in forebrain GABAergic neurons (CB₁R^{floxex/floxex;Dlx5/6-Cre/+} mice; herein referred to as GABA-CB₁R^{-/-} mice) or dorsal telencephalic glutamatergic neurons

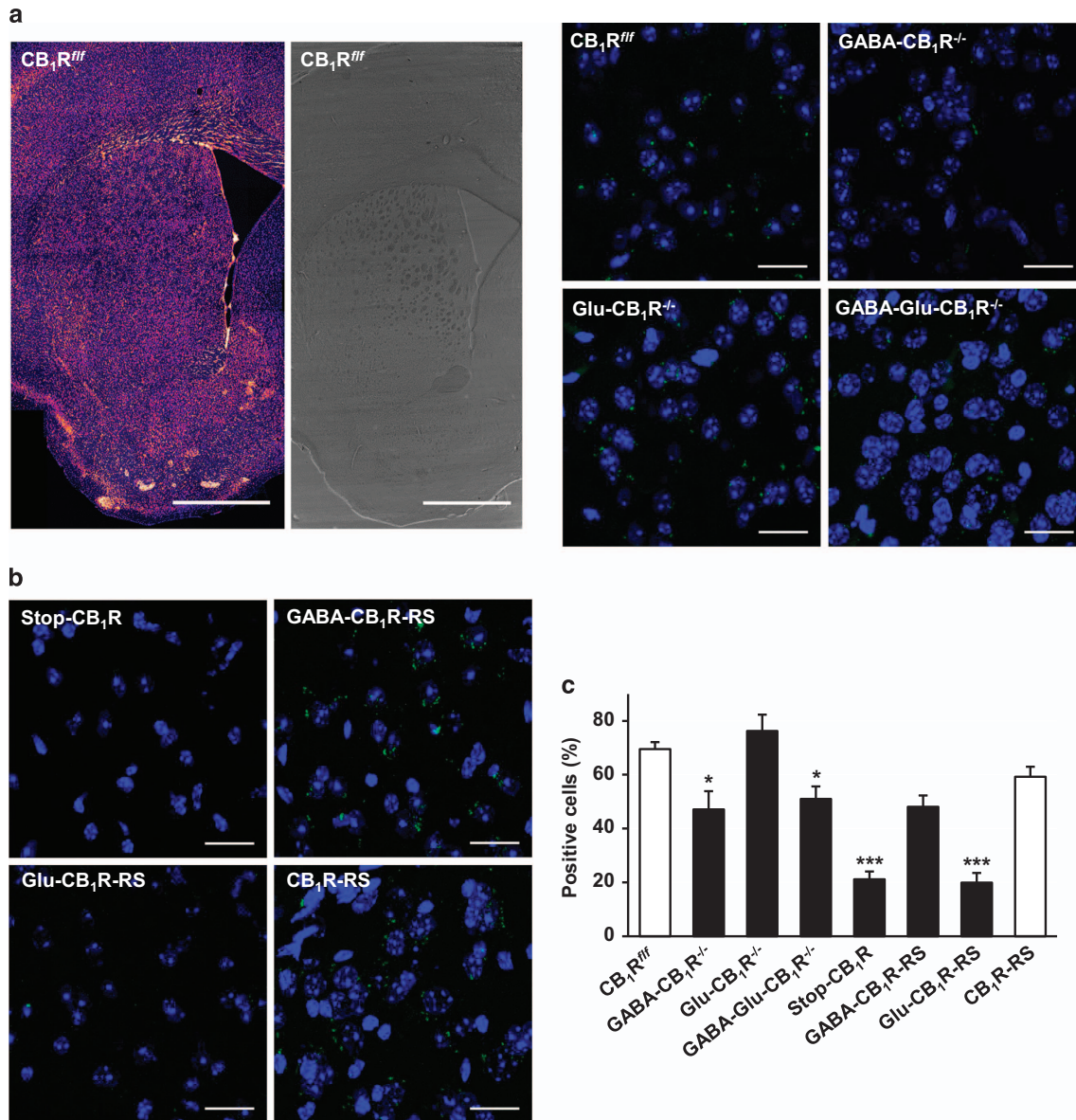


Figure 1 A_{2A}R-CB₁R heteromers are located on GABAergic neurons rather than glutamatergic projections in the mouse dorsal striatum. (a, b) PLA assays were performed in dorsal-striatum sections from 3–4-month-old mice of different genotypes. A_{2A}R-CB₁R heteromers are shown as green dots. Nuclei are colored in blue by DAPI staining. (a) Representative low-magnification image of tissue sections used for PLA assays. Left, DAPI-stained field; right, bright field. Scale bar: 1 mm. Representative pictures from control CB₁R-floxed, GABA-CB₁R^{-/-}, Glu-CB₁R^{-/-}, and GABA-Glu-CB₁R^{-/-} mice. Scale bar: 20 μm. (b) Representative pictures from Stop-CB₁R, GABA-CB₁R-RS mice, Glu-CB₁R-RS mice and CB₁R-RS mice. Scale bar: 20 μm. (c) Quantification of the number of cells containing one or more dots expressed as the percentage of the total number of cells (blue nuclei). Data are the mean ± SEM of counts in 5–14 different fields from three different animals of each type. One-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test showed a significant (**p* < 0.05, ****p* < 0.001) decrease of heteromer expression compared to control CB₁R-floxed mice (a) or to CB₁R-RS mice (b). Further details of statistical analyses are given in Supplementary Table S2.

(CB₁R^{floxed/floxed};Nex-Cre/+ mice; herein referred to as Glu-CB₁R^{-/-} mice) (Monory *et al*, 2006). Striatal A_{2A}R-CB₁R heteromers were evident almost exclusively as dots in the vicinity of cell nuclei, and showed a remarkable reduction in GABA-CB₁R^{-/-} mice (Figure 1a and c). In contrast, no significant differences were observed between Glu-CB₁R^{-/-} mice and CB₁R^{floxed/floxed};+/+ controls (Figure 1a and c) when data were expressed either as a percentage of cells containing one or more dots relative to total cell nuclei (Figure 1c) or as a total number of dots relative to total cell nuclei (CB₁R^{floxed/floxed} mice: 2.23 ± 0.16; Glu-CB₁R^{-/-} mice: 2.40 ± 0.20; *n* = 3 animals of each genotype). In addition,

Glu-CB₁R^{-/-} mice did not show any significant reduction in the percentage of A_{2A}R-CB₁R heteromer-positive cells relative to total cell nuclei in their motor cortices (CB₁R^{floxed/floxed} mice: 70.3 ± 2.3; Glu-CB₁R^{-/-} mice: 71.4 ± 3.0; *n* = 3 animals of each genotype). Likewise, the expression levels of A_{2A}R-CB₁R heteromers displayed by GABA-CB₁R^{-/-} mice were not decreased further when the CB₁R gene was simultaneously ablated in glutamatergic neurons (CB₁R^{floxed/floxed};Dlx5/6-Cre;Nex-Cre mice; herein referred to as GABA-Glu-CB₁R^{-/-} mice) (Bellocchio *et al*, 2010) (Figure 1a and c). Control experiments conducted in the absence of one of the two primary antibodies, as well as in full CB₁R^{-/-} mice (Marsicano *et al*,

2002) and full A_{2A}R^{-/-} mice (Ledent *et al*, 1997), provided strong support to the specificity of the PLA analyses performed (Supplementary Figure S1a–c). Of note, a different anti-CB₁R primary antibody provided a similar A_{2A}R-CB₁R heteromer detection (Supplementary Figure S1d). Moreover, the specificity of the primary antibodies used was also demonstrated by immunocytofluorescence studies conducted in HEK-293T cells transfected or not with cDNAs encoding human A_{2A}R or human CB₁R (Supplementary Figure S1e).

To unequivocally ascribe A_{2A}R-CB₁R heteromers to GABAergic neurons we made use of a Cre-mediated, lineage-specific CB₁R re-expression/rescue strategy in a CB₁R-null background (herein referred to as Stop-CB₁R mice) (Ruehle *et al*, 2013; De Salas-Quiroga *et al*, 2015). The selective rescue of CB₁R expression in forebrain GABAergic neurons (herein referred to as GABA-CB₁R-RS mice) was achieved by expressing Cre under the regulatory elements of the *Dlx5/6* gene (De Salas-Quiroga *et al*, 2015). In parallel, we rescued CB₁R expression selectively in dorsal telencephalic glutamatergic neurons (herein referred to as Glu-CB₁R-RS mice) by using a Nex-Cre mouse line (Ruehle *et al*, 2013). As a control, an EIIa-Cre-mediated, global CB₁R expression-rescue in a CB₁R-null background was conducted (herein referred to as CB₁R-RS mice) (Ruehle *et al*, 2013). Remarkably, the expression levels of A_{2A}R-CB₁R heteromers were notably restored in GABA-CB₁R-RS mice (Figure 1b and c). In contrast, no significant rescue of the heteromer was observed in Glu-CB₁R-RS animals when data were expressed either as a percentage of cells containing one or more dots relative to total cell nuclei (Figure 1c) or as a total number of dots relative to total cell nuclei (Stop-CB₁R mice: 0.24 ± 0.01; Glu-CB₁R-RS mice: 0.28 ± 0.04; *n* = 3 animals of each genotype).

Taken together, these data strongly support that, in the mouse dorsal striatum, A_{2A}R-CB₁R heteromers are located on GABAergic neurons rather than glutamatergic projections.

A_{2A}R-CB₁R Heteromers are Located on Indirect-Pathway MSNs in the Mouse Dorsal Striatum

The vast majority (~95%) of neurons within the striatum are MSNs (Kreitzer, 2009). These neurons differ in their neurochemical composition and form two major efferent pathways. The direct pathway consists of MSNs expressing markers such as dopamine D₁ receptor (D₁R) and substance P. It mainly projects to the substantia nigra pars reticulata and the internal segment of the globus pallidus. The indirect pathway is composed of MSNs expressing markers such as D₂R and enkephalin. It mainly projects to the external segment of the globus pallidus, which, in turn, projects to the subthalamic nucleus (Kreitzer, 2009). CB₁R is located on both direct-pathway and indirect-pathway MSNs, whereas A_{2A}R resides essentially on indirect-pathway MSNs (Schiffmann *et al*, 2007; Kreitzer, 2009; Castillo *et al*, 2012). As a consequence, A_{2A}R-CB₁R heteromers would conceivably be located on indirect-pathway MSNs. To substantiate this possibility, we first used conditional mutant mice bearing a genetic deletion of CB₁R in D₁R-expressing neurons (CB₁R^{flxed/flxed};Drd1a-Cre^{+/+} mice; herein referred to as D₁R-CB₁R^{-/-} mice) (Monory *et al*, 2007). No differences were observed in the expression of A_{2A}R-CB₁R heteromers, as assessed by PLA analyses, between D₁R-CB₁R^{-/-} mice

and control mice (Supplementary Figure S2a), thus confirming that the heteromer is not located on direct-pathway MSNs. CB₁R is essentially a presynaptic receptor that, in MSNs, resides, mainly on terminals and collaterals (Katona and Freund, 2008; Kreitzer, 2009; Castillo *et al*, 2012). Hence, we also studied the projection sites of MSNs in CB₁R^{flxed/flxed} mice. Specifically, we injected stereotactically these CB₁R^{flxed/flxed} mice with a recombinant adeno-associated viral vector encoding Cre (or EGFP to gain visualization of neuronal projections) into the dorsal striatum (or the motor cortex as control). Cre expression was driven by a CaMKIIα promoter, so it was confined to MSNs (injections into the striatum) or principal neurons (injections into the cortex) (Chiarlone *et al*, 2014). Cre-mediated excision of the *loxP*-flanked CB₁R gene in dorsal-striatum MSNs of CB₁R^{flxed/flxed} mice reduced the expression of A_{2A}R-CB₁R heteromers in the globus pallidus (Supplementary Figure S2b). In contrast, inactivation of the CB₁R gene in the motor cortices of CB₁R^{flxed/flxed} mice did not affect the expression of A_{2A}R-CB₁R heteromers on corticostriatal inputs (Supplementary Figure S2c).

Collectively, these data show that, in the mouse dorsal striatum, A_{2A}R-CB₁R heteromers are primarily located on indirect-pathway MSNs.

A_{2A}R-CB₁R Heteromers Expressed in the Mouse Dorsal Striatum are Functional

Previous reports have shown the existence of both facilitatory and inhibitory functional interactions between A_{2A}R and CB₁R (Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012). To investigate the possible role of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in these interactions we characterized in detail heteromer functionality in the dorsal striatum. For this purpose we used C57BL/6N-mouse striatal slices and conducted cell signaling experiments on two pathways coupled to A_{2A}R and CB₁R: extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. The CB₁R agonist WIN-55,212-2 or the A_{2A}R agonist CGS21680 increased ERK phosphorylation (activation) in the dorsal striatum, whereas co-incubation with both agonists abrogated ERK phosphorylation, thus demonstrating a negative cross-talk between A_{2A}R and CB₁R (Figure 2a). In addition, the CB₁R antagonist SR141716 (rimonabant) or the A_{2A}R antagonist ZM241385 prevented the ERK-activating effect of WIN-55,212-2 or CGS21680 (Figure 2a). These data show a cross-antagonism between the two receptors, a phenomenon not uncommon in heteromers. When these cross-pharmacological assays were conducted for Akt phosphorylation (activation), similar negative cross-talk and cross-antagonism processes were observed (Figure 2a). Collectively, these findings demonstrate the existence of inhibitory interactions between A_{2A}R and CB₁R in the mouse dorsal striatum.

Next, we sought to substantiate that the aforementioned negative cross-talk and cross-antagonism between A_{2A}R and CB₁R rely on A_{2A}R-CB₁R heteromers. It is generally believed that agonist binding to the extracellular pocket of GPCRs induces local conformational changes that increase signaling by opening an intracellular cavity via the movement of transmembrane helices (TMs) 5 and 6 for receptor activation, whereas, conversely, inverse agonists decrease the basal, agonist-independent, level of signaling by closing this cavity (Shoichet and Kobilka, 2012; Venkatakrisnan *et al*, 2013). In

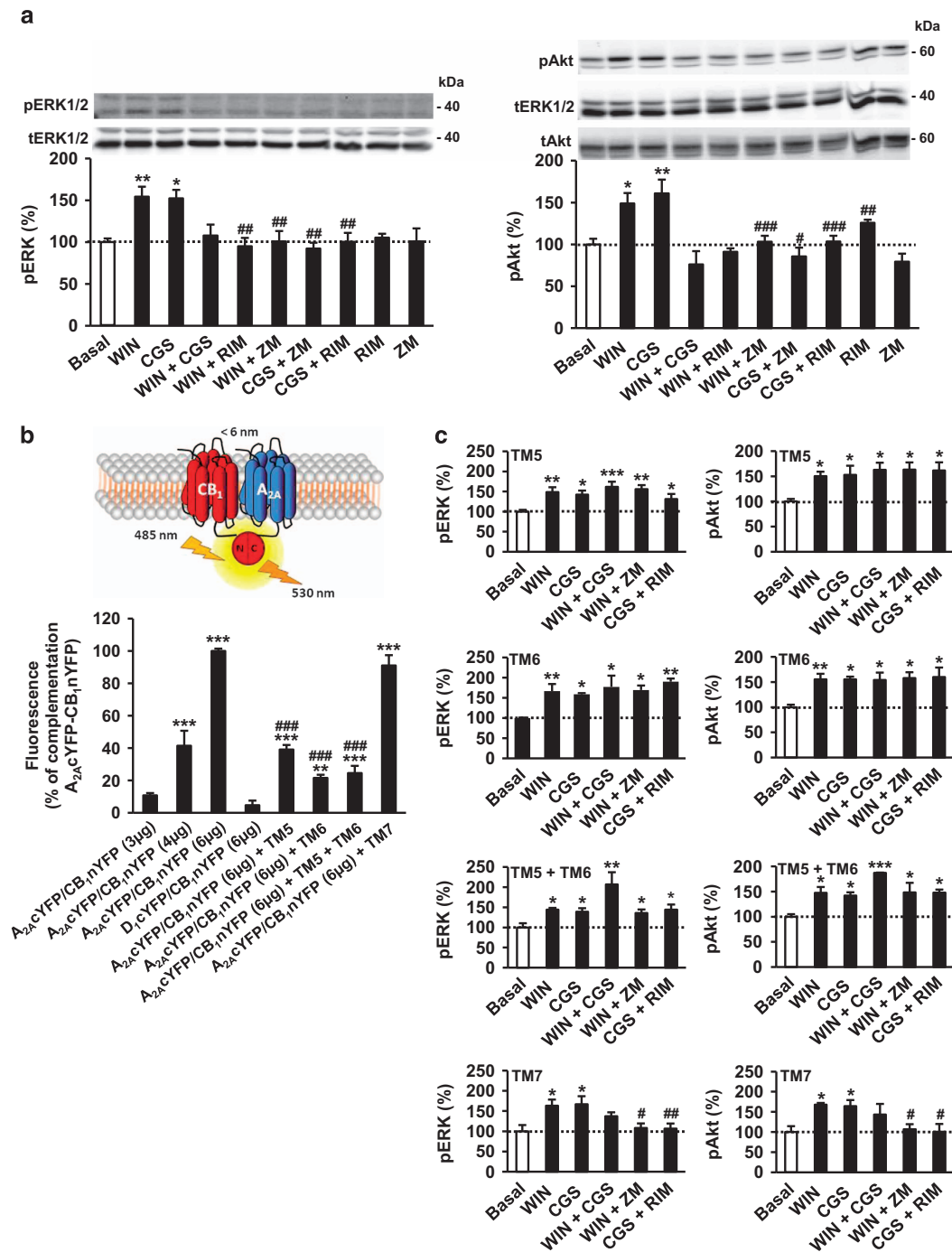
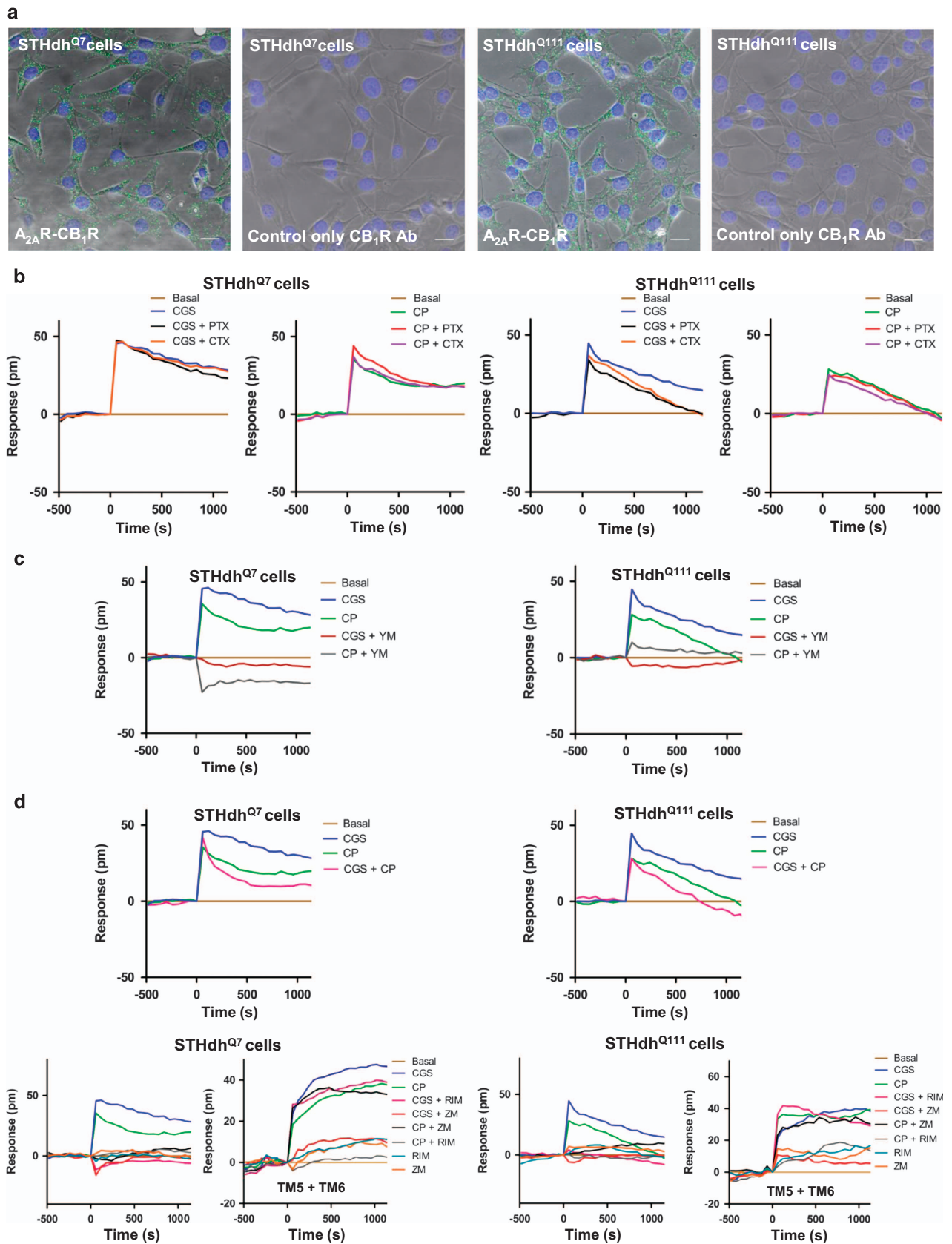


Figure 2 A_{2A}R-CB₁R heteromers expressed in the mouse dorsal striatum are functional. (a, c) ERK and Akt phosphorylation was determined in striatal slices from 3–4-month-old C57BL/6N mice pre-treated for 4 h with medium (a) or with 4 μ M TM5, TM6 or TM7 peptides alone or in combination (c). Slices were then preincubated for 20 min with vehicle, the CB₁R antagonist SRI141716 (10 μ M) or the A_{2A}R antagonist ZM241385 (10 μ M) before the addition of vehicle, the CB₁R agonist WIN-55,212-2 (1 μ M), the A_{2A}R agonist CGS21680 (1 μ M) or both, for 10 min. Immunoreactive bands from 3–6 slices from 12 different animals were quantified for each condition. Values represent mean \pm SEM of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in vehicle only-treated slices (100%, dotted line). One-way ANOVA showed a significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) effect over basal, or of agonist plus antagonist treatment over agonist-only treatment (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$). Further details of statistical analyses are given in Supplementary Table S2. In (a), representative western blots are shown at the top of each panel. (b) Schematic representation of the bimolecular fluorescence complementation technique showing that fluorescence only appears after the YFP Venus hemiprotein (cYFP or nYFP) complementation owing to the proximity of the two receptors fused to hemi-YFP Venus proteins (top panel). In the bottom panel, fluorescence at 530 nm was monitored in HEK-293T cells transfected with the indicated amounts of cDNA encoding CB₁R-nYFP and A_{2A}R-cYFP (equal amount for each construct) or, as a negative control, transfected with cDNA encoding CB₁R-nYFP and the non-interacting D₁R-cYFP. Transfected cells were treated for 4 h with medium or with 4 μ M TM5, TM6, and/or TM7 peptides before fluorescence reading. Values represent mean \pm SEM of percentage of fluorescence relative to A_{2A}R-cYFP/CB₁R-nYFP maximal complementation ($n = 4$ –12 replicates from three independent experiments for each condition). One-way ANOVA showed a significant change in fluorescence over non-transfected cells (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), or of the peptide-treated over the corresponding non-peptide treated cells (### $p < 0.001$). Further details of statistical analyses are given in Supplementary Table S2.

fact, the reported crystal structure of the agonist-bound A_{2A}R, compared with the inactive, antagonist-bound A_{2A}R, shows an outward tilt and rotation of the cytoplasmic half of TM6 and a

movement of TM5, thus resembling the changes associated with the active-state structure of other class A GPCRs (Xu *et al*, 2011). Likewise, the crystal structure of the



antagonist-bound CB₁R has been recently reported, showing a similar opsin-like behavior for this receptor (Hua *et al*, 2016; Shao *et al*, 2016). Our aforementioned observation that A_{2A}R-CB₁R heteromers display both negative cross-talk and cross-antagonism suggests a negative modulation between both receptors through protein–protein interactions involving the TM5/TM6 interface. Hence, to test this hypothesis, we studied whether synthetic peptides with the sequence of TM5, TM6 or TM7 (as negative control) of CB₁R, fused to HIV TAT peptide to allow efficient intracellular delivery and plasma membrane insertion (Schwarze *et al*, 1999; He *et al*, 2011), were able to disrupt A_{2A}R-CB₁R heteromerization and the observed bidirectional cross-signaling. This approach has been recently used by us and others to disrupt other heteromers (Guitart *et al*, 2014; Lee *et al*, 2014; Viñals *et al*, 2015).

We first characterized the TM interference peptides by the bimolecular fluorescence complementation technique. In this assay, fluorescence only appears after correct folding of two YFP Venus hemiproteins. This occurs when two receptors fused to hemi-YFP Venus proteins (cYFP or nYFP) come within proximity to facilitate YFP Venus folding (Figure 2b, scheme). Fluorescence was detected in HEK-293T cells transfected with different amounts of cDNA encoding CB₁R-nYFP and A_{2A}R-cYFP, but not in negative controls in which cells were transfected with cDNA encoding CB₁R-nYFP and the non-interacting D₁R-cYFP (Figure 2b). The TM-targeted peptides were subsequently tested. We found that treatment of cells expressing CB₁R-nYFP and A_{2A}R-cYFP with TM5 or TM6 (but not TM7) peptides disrupted the heteromer structure, as revealed by a loss of fluorescence (Figure 2b). We next studied the effect of the interference peptides on A_{2A}R and CB₁R signaling in mouse striatal slices. When the peptides were evaluated in cross-pharmacological assays, we found that pretreatment of brain slices with TM5, TM6 or both (but not TM7) peptides disrupted (i) the ability of the CB₁R agonist WIN-55,212-2 and the CB₁R antagonist SR141716 to dampen A_{2A}R-evoked actions on ERK and Akt, as well as (ii) the ability of the A_{2A}R agonist CGS21680 and the A_{2A}R antagonist ZM241385 to dampen CB₁R-evoked actions on these two signaling pathways (Figure 2c). Of note, when the TM5 and TM6 peptides were used in combination, the increase in ERK and Akt phosphorylation upon receptor co-activation tended to be higher compared with TM5-only or TM6-only incubations (Figure 2c), thus conceivably reflecting that the peptide combination is more efficient than each peptide alone in disrupting the heteromer.

Together, these data provide evidence for the importance of the TM5/TM6 interface in the A_{2A}R-CB₁R heteromer, and support that the negative cross-talk and cross-antagonism

that occurs between CB₁R and A_{2A}R are due to protein–protein interactions and are a specific biochemical characteristic of the A_{2A}R-CB₁R heteromer.

Functional A_{2A}R-CB₁R Heteromers are Present in Wild-Type and Mutant Huntingtin-Expressing Striatal Neuroblasts

To evaluate the relevance of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in a pathological setting we selected HD as a model because (i) it is the paradigmatic disease primarily caused by a selective loss of MSNs in the dorsal striatum (Walker, 2007), and (ii) changes in the expression and function of A_{2A}R and CB₁R have been shown to occur in the dorsal striatum of patients and animal models of the disease (Glass *et al*, 2000; Fernandez-Ruiz *et al*, 2011; Lee and Chern, 2014). We first characterized the heteromer in conditionally immortalized striatal neuroblasts expressing two normal (STHdh^{Q7}) or mutant (STHdh^{Q111}) full-length endogenous huntingtin alleles with 7 or 111 glutamine residues, respectively, which represent a widely accepted cellular model to investigate huntingtin actions. These cells do not exhibit mutant-huntingtin inclusions (Trettel *et al*, 2000), thus allowing the modeling of changes occurring at early HD stages.

We readily detected PLA-positive A_{2A}R-CB₁R heteromers in both STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells (Figure 3a), indicating that the mere expression of mutant huntingtin does not prevent heteromerization of both receptors. To evaluate the functional characteristics of A_{2A}R-CB₁R heteromers, we first measured the global cellular response using DMR label-free assays, which detect changes in light diffraction in the bottom 150 nm of a cell monolayer. In these experiments we had a preference for CP-55,940 over WIN-55,212-2 as the CB₁R agonist because the former is less hydrophobic than the latter and so conceivably more accessible to cultured cells. In fact, dose–response experiments conducted in both STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells showed that CP-55,940 impacted the DMR signal more markedly than WIN-55,212-2 (Supplementary Figure S3a and b). Both the A_{2A}R agonist CGS21680 and the CB₁R agonist CP-55,940 induced time-dependent signaling in STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells (Figure 3b). Of note, A_{2A}R and CB₁R-evoked signaling was essentially insensitive to pertussis toxin (PTX) or cholera toxin (CTX) (Figure 3b), thus indicating that these receptors do not significantly couple to G_i or G_s proteins in these cells. This notion was further supported by the observation that, in both STHdh^{Q7} cells (Supplementary Figure S4a) and STHdh^{Q111} cells (Supplementary Figure S4b), neither the A_{2A}R agonist nor the CB₁R agonist was able to affect basal or forskolin-elevated cAMP concentrations in the

Figure 3 A_{2A}R-CB₁R heteromers expressed in wild-type STHdh^{Q7} and mutant huntingtin-expressing STHdh^{Q111} striatal neuroblasts signal via G_q protein rather than G_i or G_s protein. (a) PLA assays were performed in STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells. A_{2A}R-CB₁R heteromers are shown as green dots. Nuclei are colored in blue by DAPI staining. Controls in the absence of anti-A_{2A}R primary antibody were also performed. Representative pictures are shown. Scale bar: 20 μm. (b) Dynamic mass redistribution (DMR) assays were performed in STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells pretreated overnight with vehicle, pertussis toxin (PTX; 10 ng/ml) or cholera toxin (CTX; 100 ng/ml), and further treated with vehicle, the A_{2A}R agonist CGS21680 (1 μM) or the CB₁R agonist CP-55,940 (1 μM). (c) DMR assays in STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells preincubated for 30 min with vehicle or the G_q protein inhibitor YM-254890 (1 μM), and then activated with the A_{2A}R agonist CGS21680 (1 μM) or the CB₁R agonist CP-55,940 (1 μM). (d) DMR assays showing negative cross-talk (top panels) and cross-antagonism (bottom panels) between A_{2A}R and CB₁R signaling. STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells were not pre-treated (top panels) or pre-treated for 4 h with medium (left bottom panels) or with 4 μM TM5 plus TM6 (right bottom panels) before incubation for 30 min with vehicle, the CB₁R antagonist SR141716 (RIM; 1 μM) or the A_{2A}R antagonist ZM241385 (1 μM), and then activated with vehicle, CGS21680 (1 μM) or CP-55,940 (1 μM). (b–d) The resulting shifts of reflected light wavelength (pm) were monitored over time. Each panel is a representative experiment of *n* = 3 different experiments. Each curve is the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicates.

absence or presence of PTX or CTX. In line with this apparent lack of ‘classical’ A_{2A}R-G_{s/olf} and CB₁R-G_i coupling, the G_q protein inhibitor YM-254890 was able to abrogate the A_{2A}R and CB₁R-evoked changes in DMR (Figure 3c). This non-conventional coupling did appear to be due to heteromer formation as experiments conducted with the TM5 and TM6 peptides on STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells showed that the peptide combination, presumably by disrupting the heteromer, turned A_{2A}R and CB₁R action to their ‘classical’, ‘protomeric’ G_{s/olf} and G_i-mediated signaling, respectively (Supplementary Figure S4c). This strongly supports that there is no limitation of G_{s/olf} or G_i protein availability in these cells, as previously indicated by others’ work (Araki *et al*, 2006), and that the A_{2A}R-CB₁R heteromer couples selectively to G_q. Moreover, and further supporting a G_q-dependent signaling for the heteromer, engagement of A_{2A}R or CB₁R increased intracellular free Ca²⁺ concentration in both STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells (Supplementary Figure S5).

We next investigated whether the heteromer-specific biochemical properties described above could influence G_q-driven signaling. Regarding negative cross-talk, the DMR signal induced by the A_{2A}R agonist CGS21680 alone or the CB₁R agonist CP-55,940 alone was attenuated when both agonists were added together to STHdh^{Q7} or STHdh^{Q111} cells (Figure 3d, top panels). Regarding cross-antagonism, the DMR signal induced by the CB₁R agonist was prevented not only by the CB₁R antagonist SR141716 but also by the A_{2A}R antagonist ZM241385, and, similarly, the DMR signal induced by the A_{2A}R agonist CGS21680 was also prevented by either antagonist (Figure 3d, bottom panels). Of note, the combination of the TM5 and TM6 peptides disrupted the cross-antagonism between A_{2A}R and CB₁R in STHdh^{Q7} and STHdh^{Q111} cells (Figure 3d, bottom panels).

Collectively, these data indicate that co-expression of A_{2A}R and CB₁R, likely through the formation of A_{2A}R-CB₁R heteromers, facilitates G_q rather than G_s or G_i coupling in wild-type and mutant huntingtin-expressing mouse striatal neuroblasts.

Functional A_{2A}R-CB₁R Heteromers are Expressed in HD Mice at Early but not Advanced Disease Stages

To study the role of A_{2A}R-CB₁R heteromers in HD *in vivo* we analyzed their expression and function in a widely accepted model of HD, heterozygous mutant knock-in Hdh^{Q7/Q111} mice, that express in heterozygosity a mutant full-length huntingtin allele with 111 glutamine residues, and wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice, that express two wild-type full-length huntingtin alleles with 7 glutamine residues. At an early stage of the disease (4 months of age), mutant Hdh^{Q7/Q111} mice displayed A_{2A}R-CB₁R heteromers in the dorsal striatum at similar levels as wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice (Figure 4a). However, at more advanced stages (6 and 8 months of age), the expression of A_{2A}R-CB₁R heteromers was almost completely lost in mutant Hdh^{Q7/Q111} mice but not wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice (Figure 4a). Of note, total striatal A_{2A}R and CB₁R expression, as determined by western blot (Supplementary Figure S6a) and immunofluorescence microscopy (Supplementary Figure S6b), was largely preserved in 6-month-old mutant Hdh^{Q7/Q111} mice compared with age-matched wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice. Hence, irrespective of the small differences found between the western

blot and immunofluorescence data, which can be conceivably due to the intrinsic characteristics of the two techniques, these findings suggest that the massive loss of A_{2A}R-CB₁R heteromers found in Hdh^{Q7/Q111} mice is mostly heteromer-selective and not primarily due to a mere reduction of total A_{2A}R and CB₁R molecules. In agreement with this notion, and as a further proof of the selective loss, the expression of another CB₁R heteromer previously reported in indirect-pathway MSNs, namely CB₁R-D₂R (Navarro *et al*, 2008; Bonaventura *et al*, 2014), was not reduced in 6-month-old mutant Hdh^{Q7/Q111} mice compared with their wild-type controls (Supplementary Figure S6c). Moreover, a remarkable loss of A_{2A}R-CB₁R heteromers was also observed in advanced stages of mouse models of HD transgenic for human mutant huntingtin exon 1, specifically R6/1 mice (Supplementary Figure S7a) and R6/2 mice (Supplementary Figure S7b). Again, the expression of CB₁R-D₂R heteromers, used as a control, did not decrease in advanced-stage R6/1 or R6/2 mice compared with age-matched wild-type animals (Supplementary Figure S7c).

CB₁R is highly abundant in most MSNs (Katona and Freund, 2008; Castillo *et al*, 2012), but it has been reported that the downregulation of CB₁R mRNA expression in R6 transgenic mice is striatum subregion-selective, occurring preferentially in the dorsolateral than the dorsomedial striatum (Denovan-Wright and Robertson, 2000; McCaw *et al*, 2004). Hence, we analyzed the expression of total A_{2A}R and CB₁R immunoreactivity, as well as that of the A_{2A}R-CB₁R heteromer, in the dorsolateral *vs* the dorsomedial striatum of wild-type Hdh^{Q7/Q7} and mutant Hdh^{Q7/Q111} mice at 6 months of age. We found no significant differences between the two dorsal-striatum compartments in total A_{2A}R immunoreactivity in either Hdh^{Q7/Q7} mice (relative values: dorsolateral: 100 ± 5.7; A_{2A}R, dorsomedial: 101.8 ± 5.7; *n* = 3 animals) or Hdh^{Q7/Q111} mice (relative values: dorsolateral: 100 ± 5.2; A_{2A}R, dorsomedial: 114.8 ± 7.8; *n* = 3 animals). There was a moderate preference of total CB₁R protein expression for the dorsolateral striatum in Hdh^{Q7/Q7} mice (relative values: dorsolateral: 100 ± 3.8; dorsomedial: 83.1 ± 2.5; *n* = 3 animals; *p* = 0.032), as well as a non-significant trend in Hdh^{Q7/Q111} mice (relative values: dorsolateral: 100 ± 2.9; dorsomedial: 85.8 ± 2.7; *n* = 3 animals). Regarding the A_{2A}R-CB₁R heteromer, we found no significant differences between the two dorsal-striatum compartments in the percentage of heteromer-positive cells relative to total cell nuclei in either Hdh^{Q7/Q7} mice (dorsolateral: 45.0 ± 4.9; dorsomedial: 44.0 ± 3.8; *n* = 3 animals) or Hdh^{Q7/Q111} mice (dorsolateral: 10.4 ± 2.3; dorsomedial: 7.5 ± 1.4; *n* = 4 animals). Overall, these data show that the A_{2A}R-CB₁R heteromer has a rather similar expression pattern in the mouse dorsolateral and dorsomedial striatum.

To study the function of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in HD mice, we performed cross-signaling experiments in striatal slices from 6-month-old Hdh^{Q7/Q7} and Hdh^{Q7/Q111} mice. Consistently with the aforementioned data on both cell and slice cultures from control C57BL/6N mice, dual agonist treatment with WIN-55,212-2 and CGS21680 depressed phospho-ERK or phospho-Akt signal compared with single-agonist stimulation in wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice, thus showing a negative cross-talk (Figure 4b and c). In addition, the action of both agonists was blocked when the slices were preincubated with the partner receptor antagonists,

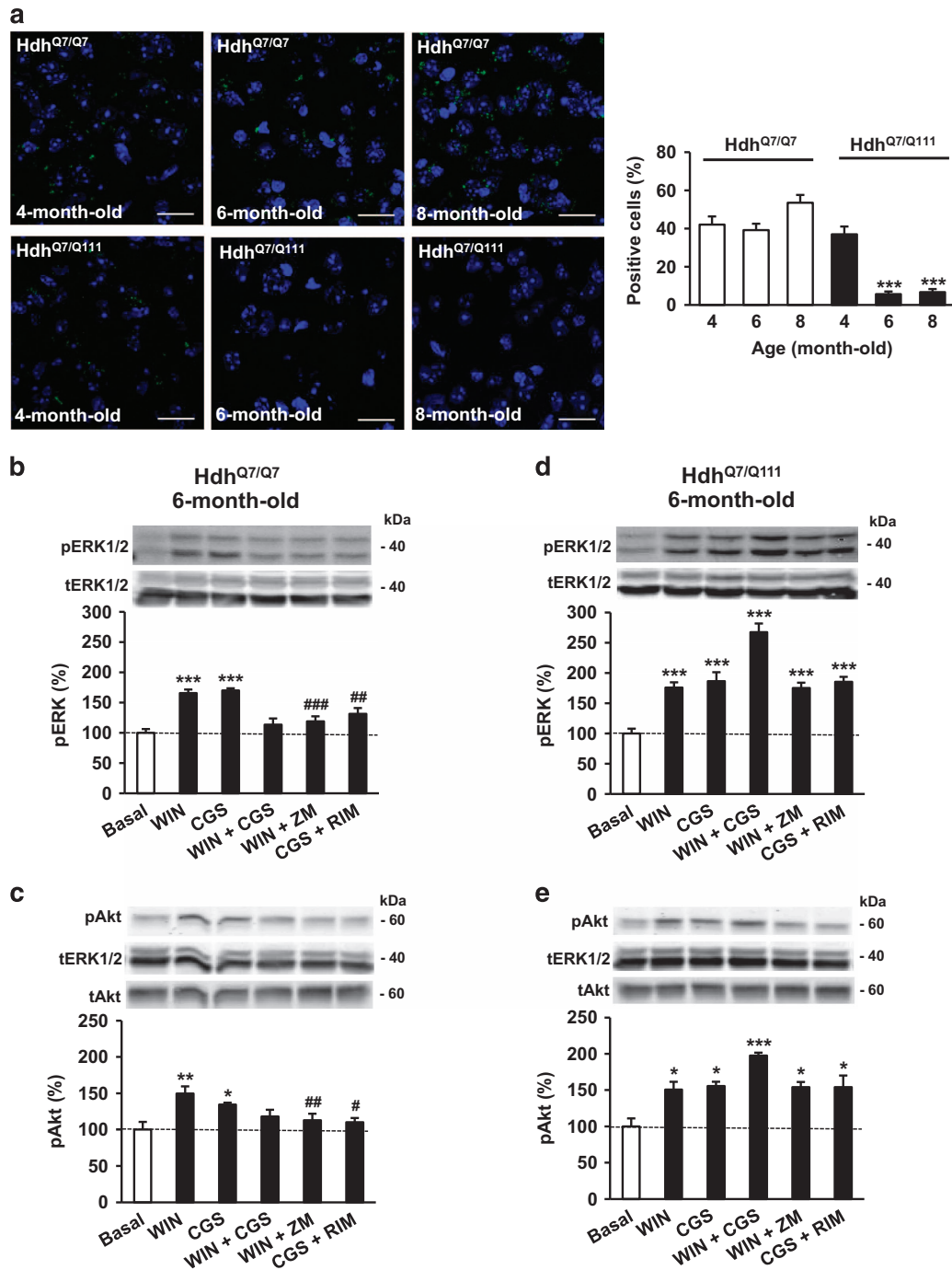


Figure 4 Functional A_{2A}R-CB₁R heteromers are expressed in Hdh^{Q7/Q111} HD mice at early but not advanced disease stages. (a) PLA assays were performed in dorsal-striatum sections from wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice and mutant huntingtin-expressing knock-in Hdh^{Q7/Q111} mice. A_{2A}R-CB₁R heteromers are shown as green dots in mice at 4, 6, and 8 months of age. Nuclei are colored in blue by DAPI staining. Representative pictures are shown. Scale bar: 20 μm. Quantification of the number of cells containing one or more dots expressed as the percentage of the total number of cells (blue nuclei). Data are the mean ± SEM of counts in 11–26 different fields from five different animals of each type. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test showed a significant (***) *p* < 0.001) decrease of heteromer expression in Hdh^{Q7/Q111} compared with the respective age-matched Hdh^{Q7/Q7} mice. (b–e) ERK phosphorylation (b, d) and Akt phosphorylation (c, e) were determined in striatal slices from 6 month-old wild-type Hdh^{Q7/Q7} mice (b, c) and mutant huntingtin-expressing knock-in Hdh^{Q7/Q111} mice (d, e). Slices were preincubated for 20 min with vehicle, the CB₁R antagonist SR141716 (RIM; 1 μM) or the A_{2A}R antagonist ZM241385 (1 μM) before the addition of vehicle or the CB₁R agonist WIN-55,212-2 (1 μM), the A_{2A}R agonist CGS21680 (1 μM), or both, for 10 min. Immunoreactive bands from 4–6 slices of 5–6 different animals were quantified for each condition. Values represent mean ± SEM of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in vehicle only-treated slices (100%, dotted line). Representative western blots are shown at the top of each panel. One-way ANOVA showed a significant effect over basal (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001), or of the antagonist plus agonist treatment over the agonist-only treatment (#*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001). Further details of statistical analyses are given in Supplementary Table S2.

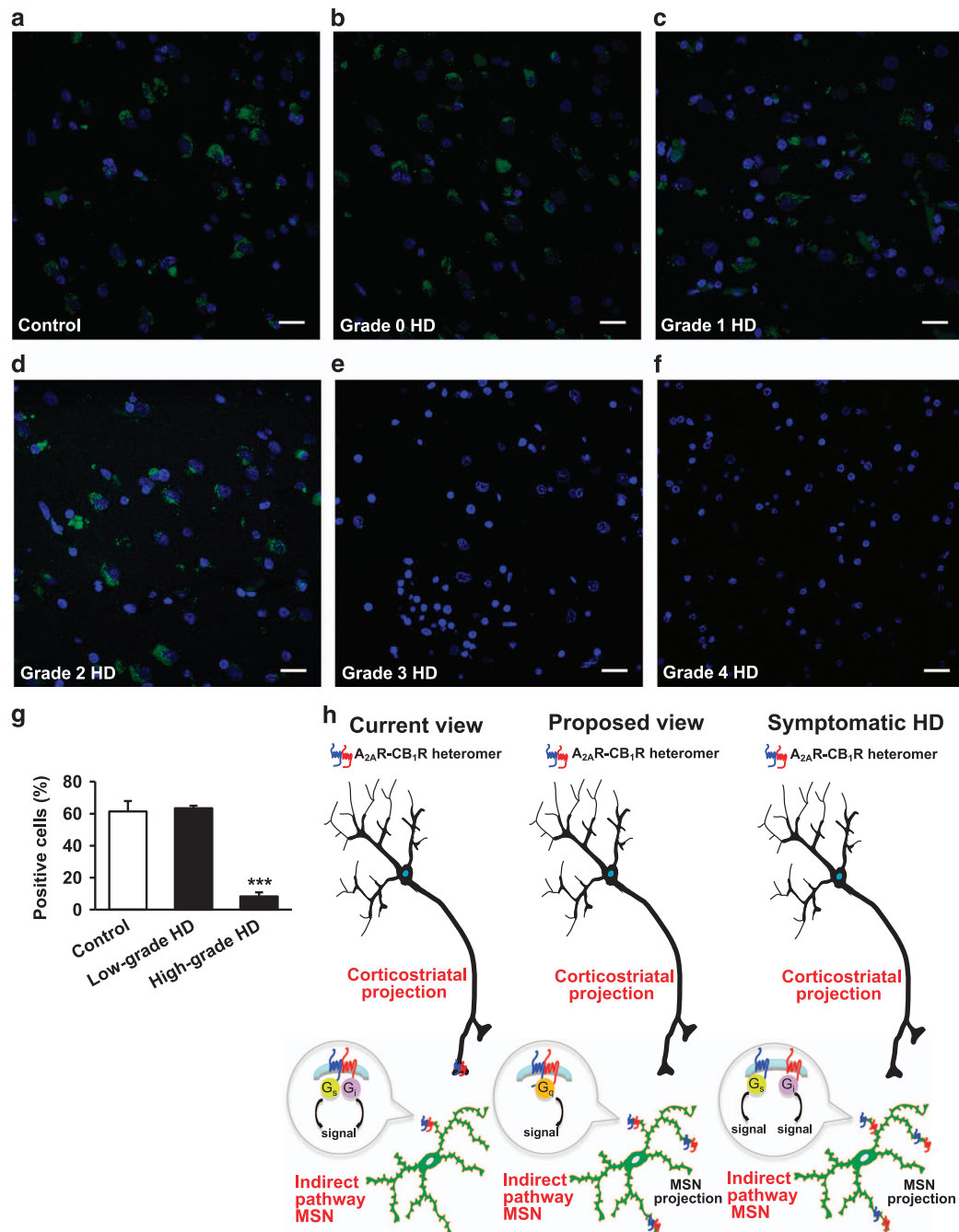


Figure 5 A_{2A}R-CB₁R heteromers are lost in the caudate-putamen of high-grade HD patients. PLA assays were performed in caudate-putamen sections of *post mortem* samples from control subjects (a) and HD patients at different grades (b–f). A_{2A}R-CB₁R heteromers are shown as green dots. Nuclei are colored in blue by DAPI staining. Representative pictures are shown. Scale bar: 20 μm. (g) Quantification of the number of cells containing one or more dots expressed as the percentage of the total number of cells (blue nuclei). Data are the mean ± SEM of counts in 21–43 different fields from five control subjects, five low-grade HD patients (1 grade 0, 2 grade 1, plus 2 grade 2) and five high-grade HD patients (2 grade 3, plus 3 grade 4). The characteristics of these human samples are shown in Supplementary Table S1. One-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test showed a significant (***) decrease of heteromer expression compared to control subjects. Further details of statistical analyses are given in Supplementary Table S2. (h) Scheme depicting the proposed location and G protein-coupling of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in the dorsal striatum. It is currently believed (*left*) that the A_{2A}R-CB₁R heteromer is located on corticostriatal projections as well as on the somatodendritic compartment of indirect-pathway MSNs. Each protomer would maintain its canonical G protein coupling (G_s for A_{2A}R, and G_i for CB₁R). In this study we propose (*middle*) that the A_{2A}R-CB₁R heteromer is located mostly on indirect-pathway MSNs, not only on their somatodendritic compartment but also likely on their terminals. According to our data, the A_{2A}R-CB₁R heteromer would facilitate G_q rather than G_s or G_i coupling. In symptomatic HD (*right*), the A_{2A}R-CB₁R heteromer would be disrupted into its constituting protomers.

SR141716 or ZM241385, thus showing cross-antagonism (Figure 4b and c). Interestingly, in Hdh^{Q7/Q111} mice this negative cross-talk and cross-antagonism signature was not detected (Figure 4d and e), in line with the PLA data showing

that the A_{2A}R-CB₁R heteromer is indeed not expressed in 6-month-old Hdh^{Q7/Q111} mice. Of note, and also in line with the data shown above, this loss of cross-signaling did not appear to be simply due to the loss of surface expression of

functional receptors, as the extent of single agonist-evoked ERK and Akt stimulation was roughly equivalent in both Hdh^{Q7/Q111} and Hdh^{Q7/Q7} mice (Figure 4b–e).

Together, these data demonstrate that a selective loss of functional A_{2A}R-CB₁R heteromers accompanies disease progression in mouse models of HD.

A_{2A}R-CB₁R Heteromers are Lost in the Caudate-Putamen of High-Grade HD Patients

We next investigated whether the aforementioned changes in A_{2A}R-CB₁R heteromer expression found in HD mouse models are also evident in HD. Thus, we used the PLA technique to analyze human caudate-putamen *post mortem* samples from control subjects and HD patients at different grades. A_{2A}R-CB₁R heteromers were readily evident in the caudate-putamen of control individuals, with a high fraction (~65%) of total cells expressing heteromers (Figure 5a and g, and Supplementary Table S1). These complexes were also detected at those normal levels in asymptomatic huntingtin gene-mutation carriers (HD grade 0) and early symptomatic HD patients (HD grades 1–2) (Figure 5b–d and g, and Supplementary Table S1). In contrast, A_{2A}R-CB₁R heteromers were strongly reduced in caudate-putamen samples from high-grade, advanced HD patients (HD grades 3–4), with only ~10% of total cells containing PLA-positive dots (Figure 5e–g, and Supplementary Table S1). PLA labeling was quite uniform in the caudate-putamen sections analyzed, and thus no perceptible differences in A_{2A}R-CB₁R heteromer expression were detected between those two nuclei within each subject (Supplementary Figure S8a and b). In addition, the demographic characteristics of the samples used indicated that the control, low-grade HD and high-grade HD subject populations were rather homogeneous (Supplementary Table S1), thus supporting that the differences found in A_{2A}R-CB₁R heteromer expression were not due to those confounding factors. Taken together, these data support that the human brain expresses A_{2A}R-CB₁R heteromers, and suggest that these complexes might serve specific functions that are impaired at late stages of HD progression.

DISCUSSION

Despite the progress made toward identifying and understanding GPCR heteromers, their promise as precision drug targets has yet to be fully realized due to the lack of detailed expression maps and functional profiles. A first important conclusion of our study refers to the precise location of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in the mouse dorsal striatum. The current view in the field supports that a major site of A_{2A}R and CB₁R colocalization is the corticostriatal-neuron terminal, at which the two receptors could physically interact to form A_{2A}R-CB₁R heteromers (Figure 5h). These presynaptic heteromers have been suggested to provide a frame to explain, at least in part, the negative pharmacological interactions between A_{2A}R and CB₁R that occur in the corticostriatal pathway (Ferre *et al*, 2010; Tebano *et al*, 2012; Ferreira *et al*, 2015; Chiodi *et al*, 2016). However, those previous studies on A_{2A}R-CB₁R heteromers, although elegant and carefully conducted, lacked state-of-the-art genetic controls and heteromer-detecting techniques. Thus,

to evaluate the possible existence of A_{2A}R-CB₁R heteromers in corticostriatal neurons, we have made use of three potent genetic models, namely (i) mice lacking CB₁R selectively in cortical glutamatergic neurons, (ii) CB₁R-deficient mice in which CB₁R expression is selectively rescued in cortical glutamatergic neurons, and (iii) CB₁R-floxed mice in which CB₁R is selectively excised in corticostriatal neurons. Systematic PLA assays conducted in these mouse models strikingly showed that the expression of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in corticostriatal projections to the dorsal striatum is negligible (Figure 1c). This finding supports that the inhibitory cross-talk processes between A_{2A}R and CB₁R reported to date in corticostriatal terminals do not rely primarily on physical interactions between the two receptors at the plasma membrane, but on other potential factors such as an opposite G_s/G_i protein-dependent downstream signaling converging on glutamate release at the presynapse, which, in turn, would conceivably lead to an opposite modulation of the mGluR₅/phospholipase C-β/diacylglycerol lipase-α (DAGLα)/2-arachidonoylglycerol (2-AG) retrograde-signaling machinery at the postsynapse (Uchigashima *et al*, 2007; Katona and Freund, 2008). In any case, this observed absence of presynaptic A_{2A}R-CB₁R heteromers does certainly not preclude that A_{2A}R and CB₁R could interact with other partners at corticostriatal terminals to form GPCR complexes, for example, the A₁R-A_{2A}R heteromer (Ciruela *et al*, 2006; Quiroz *et al*, 2009).

Another widely accepted site at which striatal A_{2A}R-CB₁R heteromers are believed to reside is the somatodendritic compartment of MSNs, the main target of corticostriatal inputs (Carriba *et al*, 2007; Schiffmann *et al*, 2007; Ferre *et al*, 2010) (Figure 5h). Here, by using (i) mice lacking CB₁R selectively in GABAergic neurons, (ii) CB₁R-deficient mice in which CB₁R expression is selectively rescued in GABAergic neurons, (iii) mice lacking CB₁R selectively in D₁R-expressing MSNs, and (iv) CB₁R-floxed mice in which CB₁R is selectively excised in MSNs, we cogently demonstrated that the A_{2A}R-CB₁R heteromer is indeed present in indirect-pathway MSNs (Figure 1 and Supplementary Figure S2). It is well established that CB₁R is largely a presynaptic receptor that is highly abundant in the resident collaterals and long-range projections of MSNs (Uchigashima *et al*, 2007; Katona and Freund, 2008). Our data support that A_{2A}R-CB₁R heteromers are not solely expressed in the somatodendritic compartment of indirect-pathway MSNs, but, most likely, also at terminals of these neurons (Figure 5h). Nonetheless, the higher PLA signal found in GABA-CB₁R^{-/-} and GABA-Glu-CB₁R^{-/-} mice compared with full CB₁R^{-/-} mice (Figure 1c and Supplementary Figure S1c) suggests that, in the dorsal striatum, A_{2A}R-CB₁R heteromers may also be located on non-GABAergic, non-glutamatergic cells/terminals such as cholinergic interneurons, dopaminergic projections, or astrocytes. We are also aware that understanding the precise role of A_{2A}R-CB₁R complexes in indirect-pathway MSNs is an extremely complex issue. This complexity is due, in part, to the possibility that A_{2A}R and CB₁R can interact with other receptors in indirect-pathway MSNs. For example, A_{2A}R is highly co-expressed with both D₂R and mGluR₅, which colocalizes with DAGLα at the perisynaptic border of dendritic spines of MSNs (Uchigashima *et al*, 2007; Katona and Freund, 2008). The activation of mGluR₅ by glutamate spillover derived from corticostriatal overactivity, which leads to DAGLα-mediated

2-AG generation, can be tuned by D₂R in MSN dendritic spines (Kreitzer and Malenka, 2005; Yin and Lovinger, 2006). In addition, A_{2A}R antagonists potentiate 2-AG release and long-term depression in indirect-pathway MSNs (Lerner *et al*, 2010). Whether these intricate interactions between A_{2A}R, D₂R and mGluR₅ rely, at least in part, on putative A_{2A}R-D₂R-mGluR₅ heteromers (Cabello *et al*, 2009) has still to be defined. To complicate the situation further, postsynaptic A_{2A}R and D₂R might form other higher-order heteromeric complexes, including a proposed A_{2A}R-CB₁R-D₂R heteromer (Navarro *et al*, 2010; Bonaventura *et al*, 2014). This functional conundrum notwithstanding, the present study provides a cogent understanding of the anatomical distribution of the A_{2A}R-CB₁R heteromer, or the complexes containing the heteromer, in the corticostriatal circuit.

Our data also support that the selective coupling to G_q protein, rather than to G_s or G_i proteins, is a biochemical hallmark of the A_{2A}R-CB₁R heteromer in striatal cells (Figure 5h). A G protein switch has in fact been suggested to occur in several GPCR heteromerization processes. For example, a change from the archetypical G_s-coupled D₁R (either as monomer or as D₁R-D₁R homomers) to non-canonical G_i-coupled D₁R-HT₃R heteromer has been observed (Ferrada *et al*, 2009). In addition, formation of the CB₁R-5-HT_{2A}R heteromer may lead to a switch in G protein coupling for 5-HT_{2A}R from G_q to G_i protein (Viñals *et al*, 2015). Thus, it is possible that in a striatopallidal MSN, there is a coexistence of A_{2A}R and CB₁R (as both monomers and A_{2A}R-A_{2A}R and CB₁R-CB₁R homomers), which are widely believed to couple to G_{s/olf} and G_i proteins, respectively, together with A_{2A}R-CB₁R heteromers, which could couple non-canonically to G_q protein. How these processes of GPCR protein-protein interaction and subsequent G protein 'shuffling' affect corticostriatal circuitry is as yet unknown. It is conceivable that the arrangement of the aforementioned heteromers from A_{2A}R and CB₁R protomers in striatopallidal MSNs, by recruiting activatory G_q proteins, would be a way to fuel the indirect pathway and therefore blunt motor activity. However, such a functional outcome is difficult to predict as, according to the currently accepted models of basal ganglia function, motor activation relies on the simultaneous and coordinated activation of the direct and indirect striatal pathways (Nelson and Kreitzer, 2014). In any case, our data support the existence of different pools of A_{2A}R and CB₁R with different G protein coupling in corticostriatal projections, striatopallidal MSNs and striatonigral MSNs, thus providing adenosinergic and cannabinergic cross-signaling with an extreme degree of complexity.

To study whether the A_{2A}R-CB₁R heteromer is affected in a pathological setting we selected HD as the archetypal neurodegenerative disease that primarily affects MSNs in a selective manner. A significant number of studies have dealt with CB₁R expression and function in HD. In particular, a downregulation of CB₁R expression has been documented in the caudate-putamen of HD patients and the dorsal striatum of some HD animal models, which seems to reflect the characteristic damage pattern of MSNs (Glass *et al*, 2000; Fernandez-Ruiz *et al*, 2011). In addition, we (Blazquez *et al*, 2011) and others (Mievis *et al*, 2011b) have demonstrated a neuroprotective role of CB₁R in transgenic mouse models of HD. Likewise, administration of the cannabinoid agonist THC to HD mice prevented disease progression as assessed

by behavioral, neuropathological, and molecular markers (Blazquez *et al*, 2011). In sum, it is currently believed that CB₁R may be neuroprotective in HD. Regarding A_{2A}R, its expression has been shown to decrease in striatopallidal MSNs from the caudate-putamen of HD patients and the dorsal striatum of some HD animal models (Glass *et al*, 2000; Lee and Chern, 2014). However, the precise role of A_{2A}R in HD progression is not obvious yet, as conflicting results have been reported. Thus, administration of the A_{2A}R agonist CGS21680 to HD mice prevented neuropathological deficits and improved motor alterations, although it had no effect on body weight or lifespan (Chou *et al*, 2005). Likewise, the dual-function compound T1-11, which simultaneously activates A_{2A}R and blocks adenosine transport, improved motor coordination deficits, reduced striatal huntingtin aggregates, and normalized proteasomal activity (Huang *et al*, 2011). Genetic ablation of A_{2A}R in HD mice worsened motor performance, decreased animal survival, and reduced striatal enkephalin expression (Mievis *et al*, 2011a), and also reversed working memory deficits (Li *et al*, 2015). However, and in striking contrast, administration of the A_{2A}R antagonist SCH58261 exerted beneficial effects in HD mice by attenuating anxiety-like responses and sensitivity to excitotoxins, although it had no effect on motor coordination (Domenici *et al*, 2007). Because of these (at least apparently) contradictory data coming from various A_{2A}R gain-of-function and loss-of-function approaches, it is conceivable that A_{2A}R can mediate different (even opposing) molecular and physiopathological mechanisms depending on its cellular location and, hence, its extent of heteromerization. It has been proposed that a selective functional impairment of A_{2A}R located on striatopallidal MSNs occurs at pre-symptomatic stages of HD, whereas presynaptic A_{2A}R function is not affected (Orzu *et al*, 2011). Of note, CB₁R is also lost in MSNs but not in corticostriatal projections along HD progression (Chiodi *et al*, 2012; Chiarlone *et al*, 2014). This suggests that the corticostriatal pool of non-heteromerizing A_{2A}R and CB₁R would be the main target of adenosinergic and cannabinergic drugs aimed at relieving the symptoms of HD at late stages, whereas the MSN pool of A_{2A}R-CB₁R heteromers could be an additional target of those drugs at early disease stages. As A_{2A}R-CB₁R heteromers are lost in the caudate-putamen of high-grade HD patients, the heteromer's specific functions would be impaired at advanced stages of HD progression. Thus, the fine negative cross-talk between adenosine and endocannabinoids would conceivably disappear in advanced HD, and one might speculate that the G_q specific signaling would be lost as well at those late disease stages (Figure 5h). The A_{2A}R-CB₁R heteromer is singular in both its specific localization on indirect-pathway MSNs and its biochemical characteristics owing to its coupling to non-canonical G_q-mediated signaling. Together, our findings may open a new conceptual framework to understand the role of coordinated adenosine-cannabinoid function in the indirect striatal pathway, which may be relevant in motor function and neural diseases.

FUNDING AND DISCLOSURE

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO/FEDER; grant SAF2015-64945-R to MG; grant SAF-2014-54840-R to EIC

and VC; grant SAF2015-65034-R to PG; grant SAF2015-67474-R to SG; grants SAF2014-55700-P and PCIN-2013-019-C03-03 to FC); Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED); grant PI2013/05 to MG, PJM and EIC); Comunidad de Madrid (grant S2010/BMD-2308 to MG); Generalitat de Catalunya (grant 2014-SGR-1236 to EIC); 'La Marató de TV3' Foundation (grant 20140610 to EIC; grant 20152031 to FC); Agentschap voor Innovatie door Wetenschap en Technologie (grant SBO-140028 to FC); BBSRC DTP studentship (to PJM and LB); EPSRC (grant EP/M006379/1 to LAH); Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; grant MO 1920/1-1 to KM; grant CRC-TRR 58 to BL); Institute of Health Carlos III from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant PIE14/00034 to FC; grant PI10/00172 and funding from FEDER grants to MJC and JP); The Basque Government (grant IT764-13 to PG); University of the Basque Country UPV/EHU (grant UFI11/41 to PG); Red de Trastornos Adictivos-Institute of Health Carlos III (grant RD12/0028/0004 to PG). AC is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Juan de la Cierva Program). MM is supported by the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (FPU Program). The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Cristina Blázquez, Manel Bosch, Elena García-Taboada, Ana Gómez, Bernadette Mohr, María P Muñoz, and Alicia Poplawski for their expert technical assistance.

REFERENCES

Araki KY, Fujimura S, MacDonald ME, Bhide PG (2006). Characterization of mouse striatal precursor cell lines expressing functional dopamine receptors. *Dev Neurosci* **28**: 518–527.

Azdad K, Gall D, Woods AS, Ledent C, Ferre S, Schiffmann SN (2009). Dopamine D2 and adenosine A2A receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A2A-D2 receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology* **34**: 972–986.

Bellocchio L, Lafenetre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P *et al* (2010). Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. *Nat Neurosci* **13**: 281–283.

Blazquez C, Chiarlone A, Sagredo O, Aguado T, Pazos MR, Resel E *et al* (2011). Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain* **134**: 119–136.

Bonaventura J, Navarro G, Casado-Anguera V, Azdad K, Rea W, Moreno E *et al* (2015). Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A_{2A} receptor-dopamine D₂ receptor heterotetramer. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: E3609–E3618.

Bonaventura J, Rico AJ, Moreno E, Sierra S, Sanchez M, Luquin N *et al* (2014). L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine-CB₁ cannabinoid-D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology* **79**: 90–100.

Cabello N, Gandia J, Bertarelli DC, Watanabe M, Lluís C, Franco R *et al* (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem* **109**: 1497–1507.

Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A *et al* (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **32**: 2249–2259.

Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimoto Y (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* **76**: 70–81.

Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Lujan R, Burgueno J, Canals M *et al* (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* **26**: 2080–2087.

Chiarlone A, Bellocchio L, Blazquez C, Resel E, Soria-Gomez E, Cannich A *et al* (2014). A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 8257–8262.

Chiodi V, Ferrante A, Ferraro L, Potenza RL, Armida M, Beggiato S *et al* (2016). Striatal adenosine-cannabinoid receptor interactions in rats overexpressing adenosine A₂ receptors. *J Neurochem* **136**: 907–917.

Chiodi V, Uchigashima M, Beggiato S, Ferrante A, Armida M, Martire A *et al* (2012). Unbalance of CB1 receptors expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **45**: 983–991.

Chou SY, Lee YC, Chen HM, Chiang MC, Lai HL, Chang HH *et al* (2005). CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. *J Neurochem* **93**: 310–320.

De Salas-Quiroga A, Diaz-Alonso J, Garcia-Rincon D, Remmers F, Vega D, Gomez-Canas M *et al* (2015). Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB₁ receptors on developing cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 13693–13698.

Denovan-Wright EM, Robertson HA (2000). Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience* **98**: 705–713.

Domenici MR, Scattoni ML, Martire A, Lastoria G, Potenza RL, Borioni A *et al* (2007). Behavioral and electrophysiological effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 in R6/2 Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis* **28**: 197–205.

Fernandez-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodriguez-Cueto C, Palomo-Garo C, Gomez-Canas M, Valdeolivas S *et al* (2011). Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol* **163**: 1365–1378.

Ferrada C, Moreno E, Casado V, Bongers G, Cortes A, Mallol J *et al* (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol* **157**: 64–75.

Ferre S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G *et al* (2010). Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br J Pharmacol* **160**: 443–453.

Ferreira SG, Goncalves FQ, Marques JM, Tome AR, Rodrigues RJ, Nunes-Correia I *et al* (2015). Presynaptic adenosine A_{2A} receptors dampen cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of corticostriatal glutamatergic transmission. *Br J Pharmacol* **172**: 1074–1086.

Girault JA (2012). Integrating neurotransmission in striatal medium spiny neurons. *Adv Exp Med Biol* **970**: 407–429.

Glass M, Dragunow M, Faull RL (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA_A receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* **97**: 505–519.

Guitart X, Navarro G, Moreno E, Yano H, Cai NS, Sanchez-Soto M *et al* (2014). Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D₁-D₃ receptor heterotetramer. *Mol Pharmacol* **86**: 417–429.

He SQ, Zhang ZN, Guan JS, Liu HR, Zhao B, Wang HB *et al* (2011). Facilitation of mu-opioid receptor activity by preventing delta-opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron* **69**: 120–131.

Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han GW, Wu Y *et al* (2016). Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB₁. *Cell* **167**: 750–762.

Huang NK, Lin JH, Lin JT, Lin CI, Liu EM, Lin CJ *et al* (2011). A new drug design targeting the adenosinergic system for Huntington's disease. *PLoS One* **6**: e20934.

- Justinova Z, Redhi GH, Goldberg SR, Ferre S (2014). Differential effects of presynaptic versus postsynaptic adenosine A_{2A} receptor blockade on delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) self-administration in squirrel monkeys. *J Neurosci* **34**: 6480–6484.
- Katona I, Freund TF (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* **14**: 923–930.
- Kreitzer AC (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci* **32**: 127–147.
- Kreitzer AC, Malenka RC (2005). Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum. *J Neurosci* **25**: 10537–10545.
- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ *et al* (1997). Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Nature* **388**: 674–678.
- Lee CF, Chern Y (2014). Adenosine receptors and Huntington's disease. *Int Rev Neurobiol* **119**: 195–232.
- Lee LT, Ng SY, Chu JY, Sekar R, Harikumar KG, Miller LJ *et al* (2014). Transmembrane peptides as unique tools to demonstrate the *in vivo* action of a cross-class GPCR heterocomplex. *FASEB J* **28**: 2632–2644.
- Lerner TN, Horne EA, Stella N, Kreitzer AC (2010). Endocannabinoid signaling mediates psychomotor activation by adenosine A_{2A} antagonists. *J Neurosci* **30**: 2160–2164.
- Li W, Silva HB, Real J, Wang YM, Rial D, Li P *et al* (2015). Inactivation of adenosine A_{2A} receptors reverses working memory deficits at early stages of Huntington's disease models. *Neurobiol Dis* **79**: 70–80.
- Lovinger DM (2010). Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* **58**: 951–961.
- Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG *et al* (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* **418**: 530–534.
- McCaw EA, Hu H, Gomez GT, Hebb AL, Kelly ME, Denovan-Wright EM (2004). Structure, expression and regulation of the cannabinoid receptor gene (CB1) in Huntington's disease transgenic mice. *Eur J Biochem* **271**: 4909–4920.
- Mievis S, Blum D, Ledent C (2011a). A_{2A} receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **41**: 570–576.
- Mievis S, Blum D, Ledent C (2011b). Worsening of Huntington disease phenotype in CB1 receptor knockout mice. *Neurobiol Dis* **42**: 524–529.
- Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G *et al* (2007). Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in mice. *PLoS Biol* **5**: e269.
- Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R *et al* (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron* **51**: 455–466.
- Navarro G, Carriba P, Gandia J, Ciruela F, Casado V, Cortes A *et al* (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A_{2A} G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal* **8**: 1088–1097.
- Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V *et al* (2010). Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* **285**: 27346–27359.
- Nelson AB, Kreitzer AC (2014). Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. *Annu Rev Neurosci* **37**: 117–135.
- Orru M, Zanolini JM, Quiroz C, Nguyen HP, Guitart X, Ferre S (2011). Functional changes in postsynaptic adenosine A_{2A} receptors during early stages of a rat model of Huntington disease. *Exp Neurol* **232**: 76–80.
- Quiroz C, Lujan R, Uchigashima M, Simoes AP, Lerner TN, Borycz J *et al* (2009). Key modulatory role of presynaptic adenosine A_{2A} receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *ScientificWorldJournal* **9**: 1321–1344.
- Ruehle S, Remmers F, Romo-Parra H, Massa F, Wickert M, Wortge S *et al* (2013). Cannabinoid CB₁ receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons: distinctive sufficiency for hippocampus-dependent and amygdala-dependent synaptic and behavioral functions. *J Neurosci* **33**: 10264–10277.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferre S (2007). Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* **83**: 277–292.
- Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ (1993). Adenosine A₂ receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *J Neurosci* **13**: 1080–1087.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999). *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**: 1569–1572.
- Shao Z, Yin J, Chapman K, Grzemska M, Clark L, Wang J *et al* (2016). High-resolution crystal structure of the human CB₁ cannabinoid receptor. *Nature* [Epub ahead of print].
- Shoichet BK, Kobilka BK (2012). Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* **33**: 268–272.
- Taura J, Fernandez-Duenas V, Ciruela F (2015). Visualizing G protein-coupled receptor-receptor interactions in brain using proximity ligation *in situ* assay. *Curr Protoc Cell Biol* **67**: 17 17 11–16.
- Tebano MT, Martire A, Popoli P (2012). Adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁ receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res* **1476**: 108–118.
- Trettel F, Rigamonti D, Hilditch-Maguire P, Wheeler VC, Sharp AH, Persichetti F *et al* (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh^{Q111} striatal cells. *Hum Mol Genet* **9**: 2799–2809.
- Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, 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.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**: 185–194.
- Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, Cordomi A, Pastor A, de La Torre R *et al* (2015). Cognitive impairment induced by delta-9-tetrahydrocannabinol occurs through heteromers between cannabinoid CB₁ and serotonin 5-HT_{2A} receptors. *PLoS Biol* **13**: e1002194.
- Walker FO (2007). Huntington's disease. *Lancet* **369**: 218–228.
- Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG *et al* (2011). Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science* **332**: 322–327.
- Yin HH, Lovinger DM (2006). Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8251–8256.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

3.4. *Targeting CB₂-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling.*

Estefanía Moreno*, Clara Andradadas*, **Mireia Medrano***, María M. Caffarel, Eduardo Pérez-Gómez, Sandra Blasco-Benito, María Gómez-Cañas, M. Ruth Pazos, Andrew J. Irving, Carmen Lluís, Enric I. Canela, Javier Fernández.Ruiz, Manuel Guzmán, Peter J. McCormick*, Cristina Sánchez*.

*** Co-autores del manuscrito**

Artículo publicado en *The Journal of Biological Chemistry* 2014 Aug 8;289(32):21960-72.

Los GPCRs CB₂ y GPR55 se encuentran sobreexpresados en células cancerígenas y tumores humanos. Teniendo en cuenta que se ha sugerido la modulación de la actividad del receptor GPR55 mediante cannabinoides, analizamos si este receptor participa en los efectos de los cannabinoides en células cancerígenas. En este trabajo mostramos que los receptores CB₂ y GPR55 forman heterómeros en células cancerígenas, que estas estructuras poseen propiedades de señalización únicas y que la modulación de estos heterómeros puede modificar la actividad antitumoral de los cannabinoides *in vivo*. Estos resultados revelan la existencia de plataformas de señalización desconocidas hasta el momento, que permiten explicar el comportamiento complejo de los cannabinoides y que pueden constituir nuevas dianas para la intervención terapéutica en oncología.

Targeting CB₂-GPR55 Receptor Heteromers Modulates Cancer Cell Signaling*

Received for publication, March 4, 2014, and in revised form, June 17, 2014. Published, JBC Papers in Press, June 18, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.561761

Estefanía Moreno,^{a,b,c,1} Clara Andradás,^{d,e,1} Mireia Medrano,^{a,b,c,1} María M. Caffarel,^{d,2} Eduardo Pérez-Gómez,^{d,e,3} Sandra Blasco-Benito,^{d,e} María Gómez-Cañas,^{b,f,g} M. Ruth Pazos,^{b,f} Andrew J. Irving,^h Carme Lluís,^{a,b,c} Enric I. Canela,^{a,b,c} Javier Fernández-Ruiz,^{b,f,g} Manuel Guzmán,^{b,d,g} Peter J. McCormick,^{a,b,c,i,4} and Cristina Sánchez^{d,e,5}

From the ^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, the ^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 28031 Madrid, Spain, the ^cInstitute of Biomedicine of the University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, the ^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology and ^eDepartment of Biochemistry and Molecular Biology III/Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, School of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain, the ^fInstituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, 28041 Madrid, Spain, the ^gInstituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid 28034, Spain, the ^hDivision of Neuroscience, Ninewells Hospital, University of Dundee, Dundee DD1 9SY, United Kingdom, and the ⁱSchool of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich NR4 7TJ, United Kingdom

Background: Cannabinoid receptor CB₂ (CB₂R) and GPR55 are overexpressed in cancer cells and control cell fate.

Results: In cancer cells, CB₂R and GPR55 form heteromers that impact the signaling of each protomer.

Conclusion: CB₂R-GPR55 heteromers drive biphasic signaling responses as opposed to the individual receptors via cross-antagonism.

Significance: These heteromers may explain some of the biphasic effects of cannabinoids and, therefore, constitute potential new targets in oncology.

The G protein-coupled receptors CB₂ (CB₂R) and GPR55 are overexpressed in cancer cells and human tumors. Because a modulation of GPR55 activity by cannabinoids has been suggested, we analyzed whether this receptor participates in cannabinoid effects on cancer cells. Here we show that CB₂R and GPR55 form heteromers in cancer cells, that these structures possess unique signaling properties, and that modulation of these heteromers can modify the antitumoral activity of cannabinoids *in vivo*. These findings unveil the existence of previously unknown signaling platforms that help explain the complex behavior of cannabinoids and may constitute new targets for therapeutic intervention in oncology.

G protein-coupled receptors participate in the control of many different physiological processes, and their deregulation contributes to numerous human diseases (1, 2). Two decades

ago, cannabinoid receptor type 1 (CB₁R)⁶ and type 2 (CB₂R) were identified and cloned (3). They are part of the endocannabinoid system, which consists at least of these two receptors, their endogenous ligands (the endocannabinoids), and the enzymes that produce and metabolize these signaling lipids (3). This system modulates a wide variety of physiological functions, including cell fate (3, 4). Therefore, it has been described that cannabinoids, in most cases via CB₁R and/or CB₂R, direct cells toward proliferation, differentiation, or death, depending on the cell type and its specific context (5). In tumor cells in particular, these compounds usually produce proliferation-inhibiting and death-inducing effects both *in vitro* and *in vivo* (6), making them promising therapeutic options for the management of cancer. More recently, another G protein-coupled receptor, G protein-coupled receptor 55 (GPR55), has been related to cannabinoids (7). In this case, the pharmacology of the receptor is controversial, and, although some authors have reported cannabinoid actions via GPR55, to date, this receptor does not formally belong to the cannabinoid receptor family (8). Several publications support that lysophosphatidylinositol (LPI), another signaling lipid, is a putative GPR55 endogenous ligand (9, 10). Like its close relatives CB₁R and CB₂R, GPR55 has been implicated in the control of cancer cell fate (11). Specifically, this receptor promotes cancer cell proliferation both in cell cultures and in animal models of cancer (12–14). However, the mechanistic details behind these effects remain

* This work was supported by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Grant P111/00295 (to C. S.), by a Ramón y Cajal fellowship (to P. J. M.), by Madrid Regional Government Grant S2010/BMD-2308 (to M. G.), and by funds from TV3 Marató Project 308/C/2013 (to P. J. M.).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: Department of Pathology, University of Cambridge, Cambridge, CB2 1QP, United Kingdom.

³ Recipient of a postdoctoral research contract from the Fundación Científica Asociación Española Contra el Cáncer.

⁴ To whom correspondence may be addressed: School of Pharmacy, CP 1.44, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich NR4 7TJ, United Kingdom. Tel.: 44-1603-597197; E-mail: p.mccormick@uea.ac.uk.

⁵ To whom correspondence may be addressed: Dept. of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, C/José Antonio Novais, 2, 28040 Madrid, Spain. Tel.: 34-913944668; Fax: 34-913944672; E-mail: cristina.sanchez@quim.ucm.es.

⁶ The abbreviations used are: CB₁R, type 1 cannabinoid receptor; CB₂R, type 2 cannabinoid receptor; LPI, lysophosphatidylinositol; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; Rluc, *Renilla* luciferase; PLA, proximity ligation assay; DMR, dynamic mass redistribution; THC, Δ⁹-tetrahydrocannabinol; PTX, pertussis toxin; CTX, cholera toxin; HBA, 4-[4-(3-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-6-oxo-1H,4H,5H,6H-pyrrolo[3,4-c]pyrazol-5-yl]benzoic acid; FK, forskolin; ANOVA, analysis of variance.

unclear, in part because of the lack of clarity regarding the pharmacology of the receptor.

The classical pharmacological paradigm associating one ligand with one receptor and one receptor with one signaling pathway is being replaced with the view that G protein-coupled receptor-receptor interactions are an important mechanism that can modulate the pharmacological properties of each protomer (15). Here we aimed to determine whether CB₂R and GPR55, two receptors that are overexpressed in most human tumors and control cancer cell fate (6, 12, 13), can form heteromers in cancer cells and, if so, whether these complexes might play a role in cannabinoid signaling in tumors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells, Cell Cultures, and Transfections—HEK293 AD cells stably expressing CB₂R (HEK-CB₂) or HA-GPR55 (HEK-GPR55) or coexpressing both receptors (HEK-CB₂-GPR55) were developed as described previously (16, 17). All HEK293-derived cells were grown in DMEM (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin/streptomycin, minimal essential medium non-essential amino acid solution (1/100), and 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Invitrogen) in the presence of the corresponding selection antibiotic (0.2 mg/ml of zeocin for HEK-CB₂ cells, 0.3 mg/ml of G418 for HEK-GPR55 cells, or 0.2 mg/ml of zeocin and 0.3 mg/ml of G418 for HEK-CB₂-GPR55 cells). BT474 human breast adenocarcinoma cells endogenously expressing CB₂R and GPR55⁷ or stably transfected with a 3×HA-GPR55 construct (BT474-GPR55) and selected by FACS were maintained in RPMI medium supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin, and 0.4 mg/ml G418. Human glioblastoma T98G cells endogenously expressing CB₂R and GPR55 (at similar levels as BT474 cells)⁷ or stably transfected with selective CB₂R or GPR55 shRNAs (Genecopoeia, Rockville, MD) and selected by FACS were grown in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin/streptomycin, minimal essential medium non-essential amino acid solution (1/100), and 10% (v/v) heat-inactivated FBS in the presence of the corresponding selection antibiotic (5 μg/ml puromycin for T98G-shGPR55 and T98G-shCB₂). For transient transfections, HEK293 and BT474 cells were transfected with the corresponding fusion protein cDNA by the PEI (Sigma) method (18).

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)—For BRET, GPR55-Rluc, CB₂R-YFP, and Ghrelin 1a receptor-YFP fusion proteins were obtained as follows. The human cDNAs for CB₂R, GPR55, or the Ghrelin 1a receptor were cloned into pcDNA3.1 and amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring unique EcoRI and BamHI sites for CB₂R or the ghrelin receptor or harboring HindIII and BamHI for GPR55. The amplified fragments were subcloned to be in-frame with *Renilla* luciferase (Rluc) into the EcoRI and BamHI restriction sites of the pcDNA3.1-RLuc vector (pRLuc-

N1, PerkinElmer Life Sciences) or the pEYFP-N1 vector (enhanced yellow variant of GFP, Clontech, Heidelberg, Germany) to generate the plasmids that express proteins fused to RLuc or YFP on the C-terminal end (GPR55-RLuc, CB₂R-YFP, and Ghrelin 1a receptor-YFP). The expression of the constructs was tested as described previously (19). HEK293 or BT474 cells were transiently cotransfected with a constant amount of cDNA encoding for proteins fused to RLuc as a BRET donor and with increasing amounts of the cDNA corresponding to proteins fused to YFP as a BRET acceptor. The fusion protein expression and BRET values were quantified as described previously (20) using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short wavelength filter at 485 nm (440–500 nm) and the long wavelength filter at 530 nm (510–590 nm) (20). The net BRET is defined as [(long wavelength emission)/(short wavelength emission)] – Cf, where Cf corresponds to [(long wavelength emission)/(short wavelength emission)] for the donor construct expressed alone in the same experiment. Data were fitted to a non-linear regression equation, assuming a single phase saturation curve with GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA). BRET is expressed as milliBRET units (net BRET × 1000). In saturation curves, the relative amount of BRET is given as a function of 100 × the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc).

In Situ Proximity Ligation Assays (PLA)—Cells were grown on glass coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde, washed with PBS containing 20 mM glycine, permeabilized with the same buffer containing 0.05% Triton X-100, and washed successively with PBS. CB₂R-GPR55 heteromers were detected using the Duolink II *in situ* PLA detection kit (Olink, Bioscience, Uppsala, Sweden). After 1 h of incubation at 37°C with the blocking solution in a preheated humidity chamber, cells were incubated overnight in the antibody dilution medium with a mixture of equal amounts of mouse anti-HA antibody (1:100, Sigma) or rabbit anti-GPR55 antibody (1:100, Abcam, Cambridge, UK) coupled directly to a DNA minus chain to detect HA-GPR55 or endogenous GPR55 and rabbit anti-CB₂R antibody (1:100, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) coupled directly to a DNA plus chain. Cells were washed with wash buffer A at room temperature and incubated in a preheated humidity chamber for 30 min at 37°C with the ligation solution (Duolink II ligation stock, 1:5, and Duolink II ligase, 1:40) to induce annealing and ligation of the two DNA probes. Amplification was done with the Duolink II detection reagents red kit, which contains fluorescence nucleotides. After exhaustive washing at room temperature with wash buffer B, cells were mounted using mounting medium with DAPI. The samples were observed under a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Red fluorescent images were processed with ImageJ software. PLA requires that both receptors be close enough to allow the two different antibody-DNA probes to be able to ligate (<17 nm) (21, 22). If the receptors are within sufficient proximity, a punctate fluorescent signal can be detected by confocal microscopy.

Dynamic Mass Redistribution (DMR) Assays—The agonist-induced cell global signaling signature was determined by label-free technology measuring the DMR using an EnSpire® multi-

⁷ E. Moreno, C. Andradás, M. Medrano, M. M. Caffarel, E. Pérez-Gómez, S. Blasco-Benito, M. Gómez-Cañas, M. R. Pazos, A. J. Irving, C. Lluís, E. I. Canela, J. Fernández-Ruiz, M. Guzmán, P. J. McCormick, and C. Sánchez, unpublished data.

CB₂R-GPR55 Heteromers in Cancer Cells

mode plate reader (PerkinElmer Life Sciences) (23). Refractive waveguide grating optical biosensors, integrated in 384-well microplates, allowed measurements of changes in local optical density in a detection zone up to 150 nm above the surface of the sensor. Cellular mass movements induced upon receptor activation were detected by illuminating the underside of the biosensor with polychromatic light and measured as changes in wavelength of the reflected monochromatic light that is a function of the index of refraction. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) is directly proportional to the amount of cell movement. Briefly, 24 h before the assay, cells (10,000 cells/well) were seeded in 384-well sensor microplates and cultured to obtain 70–80% confluent monolayers. Before the assay, cells were washed twice with assay buffer (Hanks' balanced salt solution with 20 mM HEPES (pH 7.15)) and incubated for 2 h in assay buffer with 0.1% dimethyl sulfoxide in the reader at 24 °C. Thereafter, the sensor plate was scanned, and a baseline optical signature was recorded before adding the test compounds dissolved in assay buffer containing 0.1% dimethyl sulfoxide. DMR responses were monitored for at least 2000 s. Kinetic results were analyzed using EnSpire workstation software version 4.10.

cAMP Production—Homogeneous time-resolved (TR) fluorescence energy transfer (FRET) assays were performed using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer Life Sciences) on the basis of the competitive displacement of a europium chelate-labeled cAMP tracer bound to a specific antibody conjugated to acceptor beads. We first established the optimal cell density for an appropriate fluorescent signal. This was done by measuring the TR-FRET signal, determined as a function of forskolin concentration using different cell densities. The forskolin dose-response curves were related to the cAMP standard curve to establish which cell density provides a response that covers most of the dynamic range of the cAMP standard curve. Cells (1000 cells/well) were pretreated with the antagonists or the corresponding vehicle (dimethyl sulfoxide) in white ProxiPlate 384-well microplates (PerkinElmer Life Sciences) at 25 °C for 20 min and stimulated with agonists for 15 min before adding 0.5 μM forskolin or vehicle and incubating for an additional 15-min period. Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with a homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer optical module (BMG Lab Technologies, Offenburg, Germany).

ERK-1/2 Phosphorylation—Cells (35,000 cells/well) seeded in 96-well poly-D-lysine-coated plates (Sigma-Aldrich) were pretreated at 25 °C for 20 min with the antagonists and stimulated for an additional 7 min with the indicated agonists. Phosphorylation was determined in white ProxiPlate 384-well microplates (PerkinElmer Life Sciences) by α-screen bead-based technology using the amplified luminescent proximity homogeneous assay kit (PerkinElmer Life Sciences) and the EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer Life Sciences). Phosphorylation is expressed in arbitrary units, ALPHA counts, as measured by light emission at 520–620 nm by the acceptor beads. To evaluate phospho-ERK-1/2 expression in tumors, a Western blot analysis was performed. Tumor lysates were subjected to SDS-PAGE, and proteins were transferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Blots were incubated with anti-

phospho-ERK (Thr-202/Tyr-204), anti-ERK (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), and anti-α-tubulin (Sigma-Aldrich) antibodies. Luminograms were obtained with the Amersham Biosciences enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare), and the densitometric analysis was performed with Quantity One software (Bio-Rad).

[³⁵S]GTPγS Binding Assays—HEK-GPR55 cells were rinsed twice in phosphate-buffered saline, detached from dishes by incubation with a buffer containing 5.6 mM glucose, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 137 mM NaCl, and 1 mM EGTA (pH 7.4), and collected by centrifugation (500 × g) at 4 °C. The pellets were then resuspended in ice-cold lysis buffer (0.2 mM MgSO₄, 0.38 mM KH₂PO₄, 0.61 mM Na₂HPO₄, and 0.5% PMSF (pH 7.4)) and homogenized by vortexing. HEK-GPR55 membranes were isolated by centrifugation (20,000 × g for 20 min), and pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Protein concentration was determined by detergent compatible protein assay kit (Bio-Rad). Membranes were stored at –80 °C until used for analysis of LPI-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding. For this analysis, we followed a procedure published previously (24) in which cell membranes (20 μg of protein/ml) were incubated for 120 min at 30 °C in assay buffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 μM GDP, and 1 mg/ml BSA (pH 7.4)) containing 0.1 nM [³⁵S]GTPγS and increasing concentrations of LPI (10^{–10}–10^{–5} M) in the presence or absence of 10^{–6} M Δ⁹-tetrahydrocannabinol (THC, The Health Concept, Richelbach, Germany). Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM unlabeled GTPγS. Reactions were terminated by rapid filtration performed by a Harvester Filtermate (PerkinElmer) with Filtermate A GF/C filters. Filters were rinsed nine times with washing buffer (50 mM Tris-HCl and 1 mg/ml BSA (pH 7.4)) and left to dry, and melt-on scintillation pads (Meltilex A, Perkin Elmer Life Sciences) were melted onto them. The bound radioactivity was quantified by a liquid scintillation spectrophotometer (Wallac MicroBeta Trilux, PerkinElmer Life Sciences). Results were normalized as percent change over basal level (set at 100%) and corresponded to three separate experiments, each performed in triplicate. Data were analyzed by nonlinear regression analysis of sigmoidal dose-response curves using GraphPad Prism 5.01.

Tumor Generation and Animal Treatments—Tumors were induced in 6-week-old athymic male mice (n = 6/experimental group; Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain) by subcutaneous injection of 10 × 10⁶ T98G human glioblastoma cells in PBS supplemented with 0.1% glucose. Half of the animals were treated with double-stranded RNA duplexes for human GPR55 (ON-TARGETplus SMARTpools) from Dharmacon-Thermo Scientific (Lafayette, CO). The sequences were 5'-GAAUCC-GCAUGAACAUCAUU-3', 5'-GAGAAACAGCUUUAUCG-UAAUU-3', 5'-AAGAACAGGUGCCCGAUUUU-3', and 5'-GCUACUACUUUGUCAUCAAUU-3'. The other half was treated with a non-targeted control siRNA from Applied Biosystems-Ambion (Austin, TX). The sequence was 5'-UUC-UCCGAACGUGUCACGUtt-3'. siRNA was mixed with AteloGene (Koken, Tokyo, Japan) and injected locally when tumors reached approximately 200 mm³ (day 1) and on day 7. At the same time, each group was treated peritumorally with THC (1.5

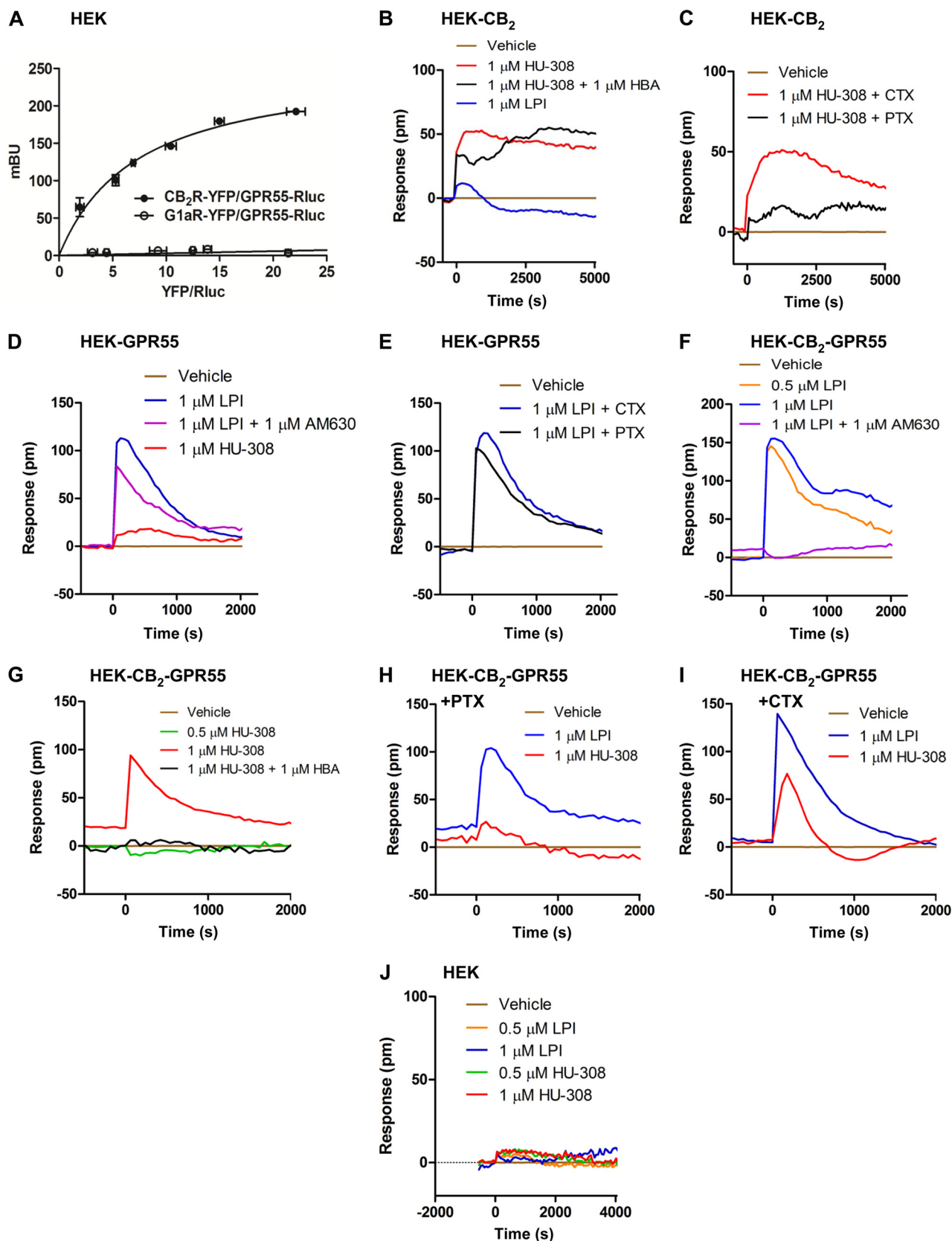


FIGURE 1. Expression and functional characterization of CB₂R-GPR55 heteromers in transfected HEK293 cells. *A*, BRET saturation experiments were performed in cells transfected with a fixed amount of GPR55-Rluc cDNA (0.5 μ g) and increasing amounts (1–5 μ g) of CB₂R-YFP or Ghrelin 1a receptor-YFP cDNAs. Values are the mean \pm S.E. of three to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor. *mBU*, milliBRET unit. *B–J*, DMR in HEK-CB₂ (*B* and *C*), HEK-GPR55 (*D* and *E*), or HEK-CB₂-GPR55 (*F–I*) cells not treated (*B*, *D*, *F*, and *G*) or treated overnight with 10 ng/ml PTX or with 100 ng/ml CTX prior to the addition of the antagonists HBA (*B* and *G*) or AM630 (*D* and *F*) and stimulation with LPI or HU-308. The resulting picometer (*pm*) shifts of reflected light wavelength versus time were monitored. Each curve is the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicates.

CB₂R-GPR55 Heteromers in Cancer Cells

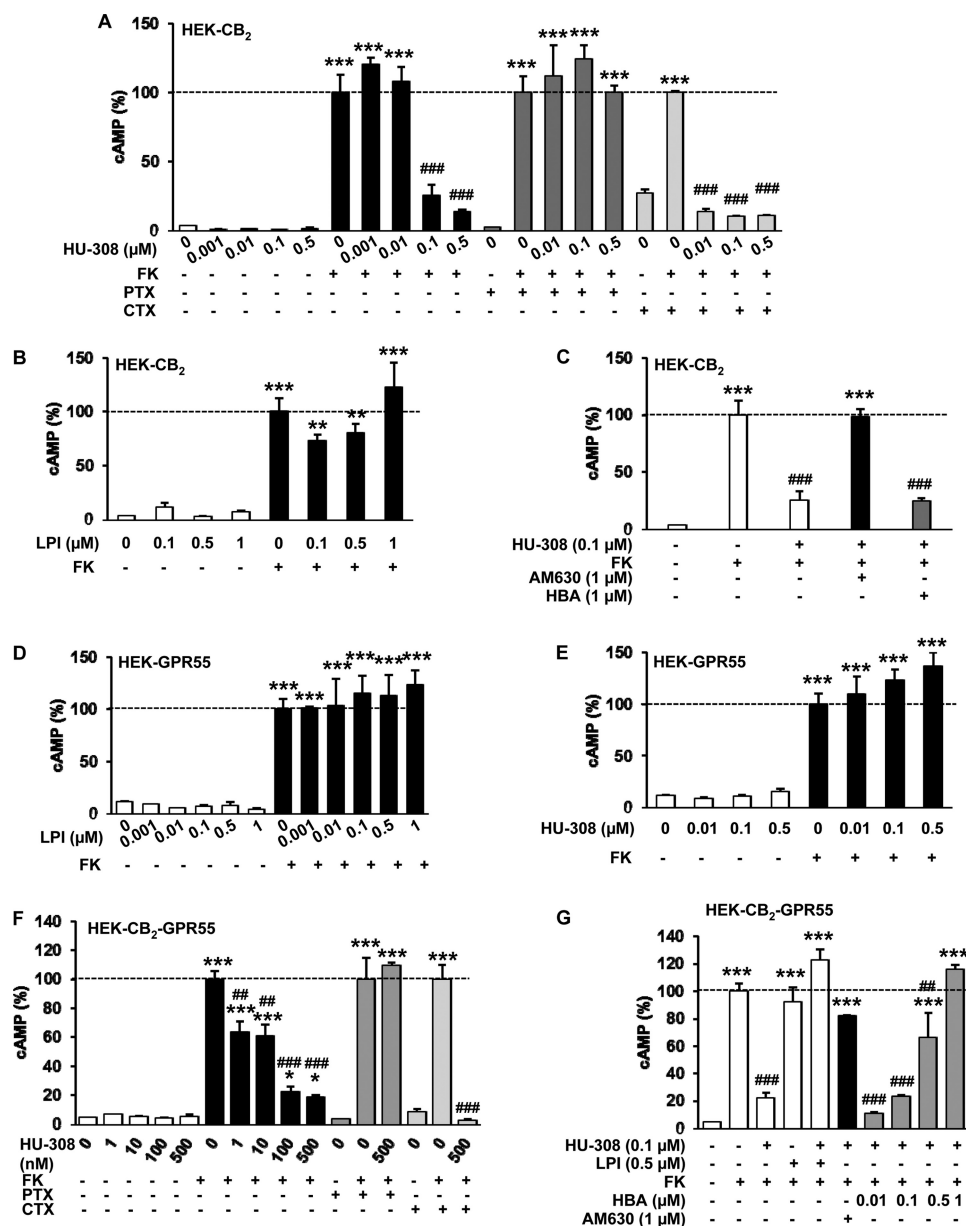


FIGURE 2. **cAMP signaling in HEK293 cells expressing single receptors or CB₂R-GPR55 heteromers.** cAMP production in HEK-CB₂ (A–C), HEK-GPR55 (D and E), or HEK-CB₂-GPR55 cells (F and G) treated (A and F) or not treated (B–E and G) overnight with 10 ng/ml PTX or with 100 ng/ml CTX. Cells were preincubated with vehicle or with the antagonists AM630 or HBA and stimulated with increasing concentrations of HU-308 or LPI in the absence or presence of 0.5 μM FK. Values are mean ± S.E. of *n* = 4–7 and are expressed as a percentage of the FK-treated cells in each condition. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated cells (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001) or over the FK effect (##, *p* < 0.01; ###, *p* < 0.001).

or 15 mg/kg/day) (The Health Concept) or the corresponding vehicle (PBS supplemented with 5% BSA) for 15 days. Tumors were measured routinely with external calipers, and the volume was calculated as $(4\pi/3) \times (\text{width}/2)^2 \times (\text{length}/2)$. At the end of the treatment, animals were sacrificed, and tumors were collected.

RESULTS

Expression and Functional Characterization of CB₂R-GPR55 Heteromers in Transfected HEK293 Cells—To analyze the possible molecular interaction between CB₂R and GPR55, BRET experiments were performed. HEK293 cells expressing a fixed amount of GPR55-Rluc as the BRET donor and increasing amounts of CB₂R-YFP as the BRET acceptor generated a hyper-

bolic and saturable BRET signal (Fig. 1A) with a BRET_{max} of 257 ± 18 milliBRET units and a BRET₅₀ of 7.3 ± 1.2 that was not evident in cells expressing equivalent amounts of GPR55-Rluc and Ghrelin 1a receptor-YFP as a negative control (Fig. 1A). These results support that CB₂R and GPR55 form heteromers in cotransfected cells.

We then analyzed whether the formation of these complexes alters the signaling properties of the individual protomers. To test which G proteins are coupled to the receptors when expressed alone, we used a label-free approach that measures DMR in the bottom 150 nm of a cell monolayer through detection of changes in light diffraction (23). In HEK293 cells expressing CB₂R only (HEK-CB₂), the CB₂R-selective agonist

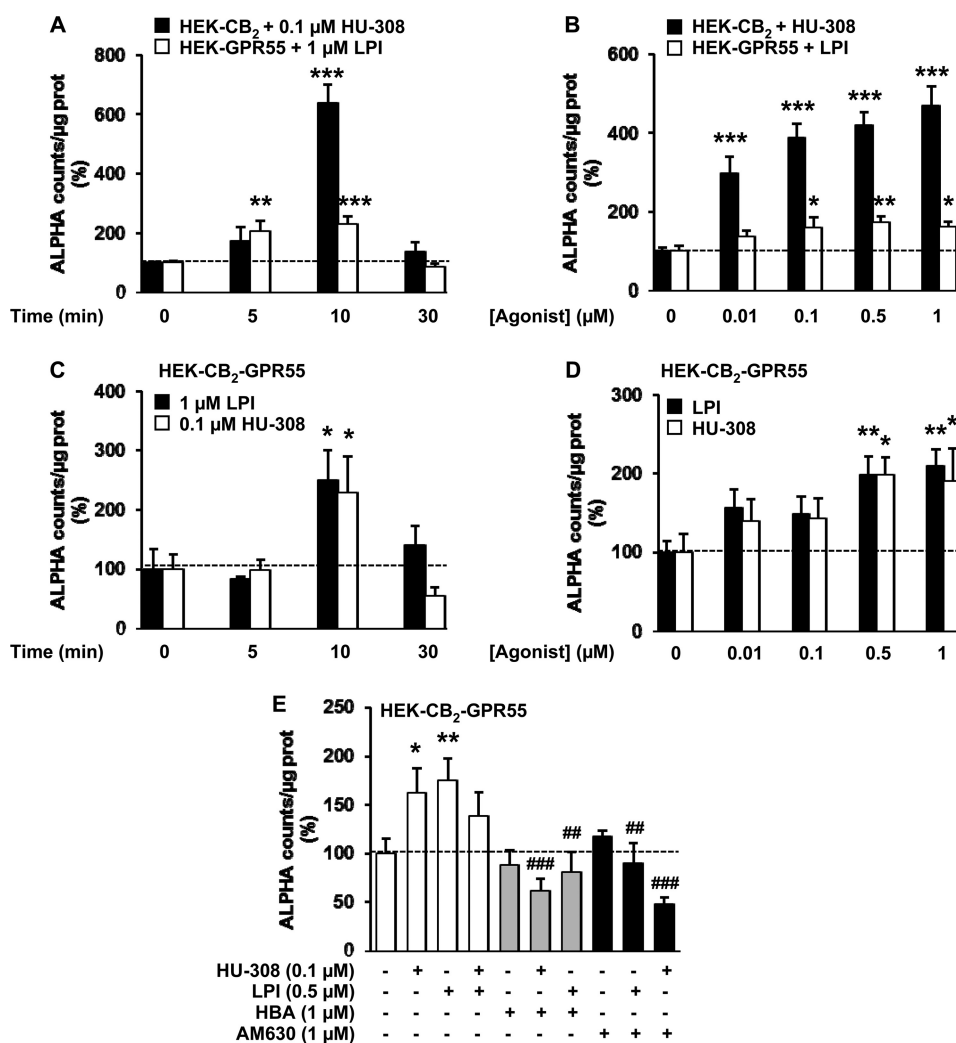


FIGURE 3. ERK-1/2 phosphorylation in HEK293 cells expressing single receptors or CB₂R-GPR55 heteromers. A and B, ERK-1/2 phosphorylation was determined in HEK-CB₂ (black columns) or HEK-GPR55 (white columns) cells stimulated with 0.1 μM HU-308 or 1 μM LPI for different times (A) or for 7 min with increasing concentrations of HU-308 or LPI (B). C–E, ERK-1/2 phosphorylation was determined in HEK-CB₂-GPR55 cells stimulated with 0.1 μM HU-308 or 1 μM LPI for different times (C), with increasing concentrations of these compounds for 7 min (D), or in cells pretreated with vehicle (white columns), with HBA (gray columns), or AM630 (black columns) prior to stimulation with HU-308, LPI, or both (E). Phosphorylation was expressed in arbitrary units (ALPHA counts, light emission at 520–620 nm). Values are mean ± S.E. of *n* = 6–9 and are expressed as a percentage over vehicle-treated cells. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated cells (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001) or of the antagonist plus agonist over the agonist treatment (E; ##, *p* < 0.01; ###, *p* < 0.001).

HU-308 produced a robust DMR signal (Fig. 1B) that was sensitive to pertussis toxin (PTX) but not to cholera toxin (CTX) (Fig. 1C). This is in line with many previous reports showing coupling of CB₂R to G_i heterotrimeric proteins (3). In HEK293 cells expressing GPR55 only (HEK-GPR55), we observed that the GPR55 agonist LPI produced a strong response (Fig. 1D) that was insensitive to CTX or PTX treatment (Fig. 1E), suggestive of coupling to G proteins other than G_i and G_s, as reported previously (8). Importantly, neither LPI nor HU-308 showed any activity in non-transfected cells (Fig. 1J), and both CB₂R and GPR55 agonists and antagonists showed selectivity for their respective receptors with no agonist activation or antagonist blockade of the partner receptor in single receptor-expressing cells (Fig. 1, B and D). Interestingly, in HEK293 cells overexpressing both receptors (HEK-CB₂-GPR55), we observed a similar coupling to G proteins but a different pharmacological behavior. In these cells, LPI induced a robust DMR signal (Fig. 1F) that was insensitive to CTX or PTX treatment

(Fig. 1, H and I), again suggesting coupling to G proteins different from G_i and G_s, and HU-308 induced a signal (Fig. 1G) that was blocked by PTX but not by CTX (Fig. 1, H and I), indicating a G_i coupling. Surprisingly, the signal induced by LPI was completely blocked by the CB₂R antagonist AM630 (Fig. 1F), and the signaling induced by HU-308 was blocked by the GPR55 antagonist 4-[4-(3-hydroxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)-6-oxo-1*H*,4*H*,5*H*,6*H*-pyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-5-yl] benzoic acid (HBA) (Fig. 1G). This cross-antagonism phenomenon suggests that, through the heteromer, one receptor can be targeted by using the partner receptor antagonist.

Because DMR experiments are indicative of global receptor signaling, we next investigated heteromer function in specific signaling pathways. In HEK-CB₂ cells, HU-308 (Fig. 2A), but not LPI (Fig. 2B), prevented the increase in cAMP levels elicited by forskolin (FK), an effect that was blocked by PTX but not by CTX (Fig. 2A) and by AM630 but not by HBA (Fig. 2C). In HEK-GPR55 cells, LPI produced no effect on FK-induced

CB₂R-GPR55 Heteromers in Cancer Cells

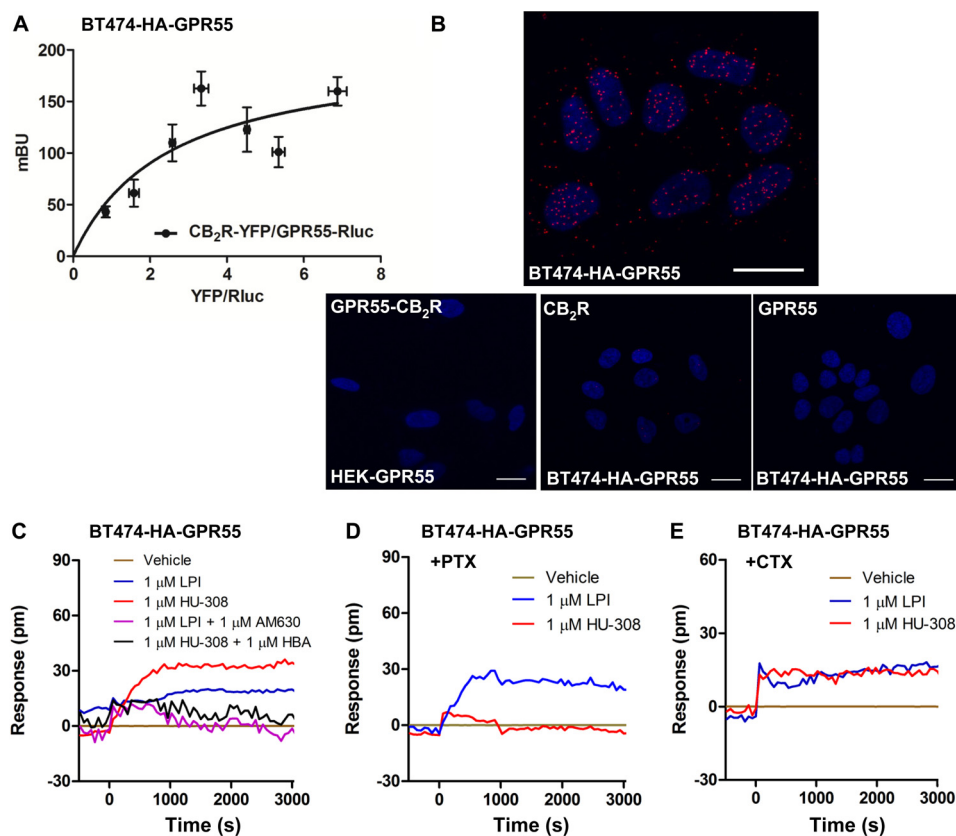


FIGURE 4. Expression and functional characterization of CB₂R-GPR55 heteromers in BT474 human breast cancer cells. *A*, BRET saturation experiments were performed in BT474 cells transfected with 1 μ g of GPR55-Rluc cDNA and increasing amounts of CB₂R-YFP cDNA (1–3 μ g). Values are given as the mean \pm S.E. of three to seven different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor. *mBU*, millibRET units. *B*, representative result of an *in situ* PLA performed in BT474-HA-GPR55 cells (*upper panel*). In the confocal microscopy image (*superimposed sections*) heteromers appear as *red spots*. Cell nuclei were stained with DAPI (*blue*). As negative controls (*bottom panels*), PLA were performed in HEK-GPR55 cells in the presence of anti-HA and anti-CB₂R antibodies or in BT474-GPR55 cells in the absence of the anti-HA (CB₂R) or the anti-CB₂R antibodies (GPR55). Scale bars = 20 μ m. *C–E*, DMR analysis in BT474-HA-GPR55 cells not treated (*C*) or treated overnight with PTX (*D*, 10 ng/ml) or CTX (*E*, 100 ng/ml) prior to preincubation with the CB₂R or the GPR55 antagonists (AM630 or HBA, respectively) and challenged with LPI or HU-308. The resulting picometer shifts of reflected light wavelength (picometer, *pm*) versus time were monitored. Each curve is the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicates.

cAMP levels (Fig. 2*D*), supporting coupling of this receptor to G proteins different from G_i or G_s. HU-308 did not induce any effect in these cells either (Fig. 2*E*). As observed in the label-free assays, HEK-CB₂-GPR55 cells showed a different pharmacological behavior. HU-308 alone was still able to block the FK-induced cAMP increase through a PTX-sensitive mechanism (Fig. 1*F*). As expected in these cells, LPI was not able to increase or decrease (Fig. 1*G*) FK-stimulated cAMP levels. However, simultaneous activation of CB₂R and GPR55 prevented HU-308 action (Fig. 1*G*), which is indicative of a negative cross-talk between both receptors. Moreover, in HEK-CB₂-GPR55 cells, HU-308 effects on cAMP levels were blocked not only by AM630 but also by HBA (Fig. 1*G*). Similar negative cross-talk and cross-antagonism were detected in ERK-1/2 signaling. When expressed alone, activation of each receptor by its selective ligand resulted in a time- and dose-dependent increase in ERK-1/2 phosphorylation (Fig. 3, *A* and *B*). In cells expressing both receptors simultaneously, the activation of any of the protomers individually produced a similar response (Fig. 3, *C* and *D*). However, coactivation of both receptors resulted in reduced ERK-1/2 phosphorylation (Fig. 3*E*). In addition, LPI-induced ERK-1/2 phosphorylation was prevented by the CB₂R antagonist, and HU-308 action was blocked by the GPR55

antagonist (*i.e.* cross-antagonist) (Fig. 3*E*). Together, these results support that CB₂R and GPR55 form heteromers in cotransfected cells and that, via these complexes, agonists and antagonists of one receptor are able to impair the signaling of the partner receptor.

Expression and Functional Characterization of CB₂R-GPR55 Heteromers in Human Breast Cancer Cells—Next we sought to determine whether CB₂R-GPR55 heteromers are present in a more physiological setting, *i.e.* human cancer cells. First, BRET saturation curves performed in human breast adenocarcinoma BT474 cells transfected to express GPR55-Rluc and increasing amounts of CB₂R-YFP indicated that these receptors also interact in cancer cells (Fig. 4*A*). This interaction was confirmed further by PLAs in BT474 cells endogenously expressing CB₂R and stably expressing HA-GPR55 (BT474-GPR55). Heteromers were readily detectable in these cells (Fig. 4*B*, *upper panel*) but not in cells not expressing CB₂R or upon removal of one of the primary antibodies (Fig. 4*B*, *bottom panels*). Of interest, the PLA-positive BT474 cells showed the same signaling profile as the aforementioned HEK-CB₂-GPR55 cells. In label-free experiments, HU-308 induced a DMR signal that was sensitive to PTX and not to CTX, LPI induced a signal that was insensitive to toxins, and both LPI- and HU308-induced signals were

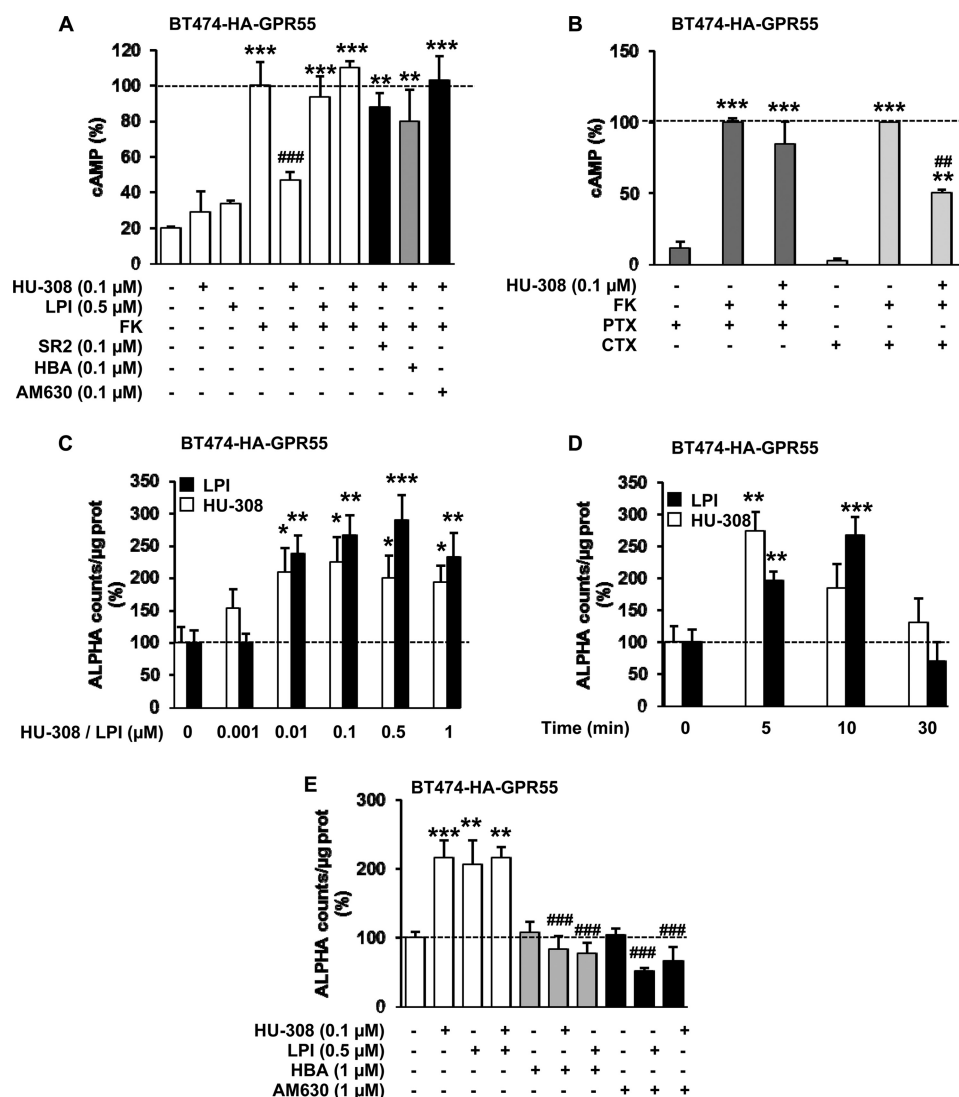


FIGURE 5. **cAMP production and ERK-1/2 phosphorylation mediated by CB₂R-GPR55 heteromers in BT474 cancer cells.** *A* and *B*, cAMP production in BT474-GPR55 cells was determined in cells not pretreated (*A*) or pretreated overnight (*B*) with 10 ng/ml PTX or with 100 ng/ml CTX prior to incubation with the CB₂R antagonists AM630 or SR144528 (*SR2*) or with the GPR55 antagonist HBA (*A*) and stimulated with HU-308, LPI, or both in the absence or in the presence of 0.5 μM FK. Values are mean ± S.E. of *n* = 3–9 and are expressed as a percentage of the FK-treated cells. *C–E*, ERK-1/2 phosphorylation was determined in BT474-GPR55 cells stimulated (7 min) with increasing concentrations of HU-308 or LPI (*C*), with 0.1 μM HU-308 or 1 μM LPI for different times (*D*), or pretreated or not treated with the CB₂R antagonists AM630 or SR144528 or with the GPR55 antagonist HBA prior to stimulation with HU-308, LPI, or both (*E*). Phosphorylation was expressed in arbitrary units (ALPHA counts, light emission at 520–620 nm). Values are mean ± S.E. of *n* = 3–9 and are expressed as a percentage of basal levels found in vehicle-treated cells. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated cells (***, *p* < 0.001; **, *p* < 0.01), over FK-treated cells (*A* and *B*; ##, *p* < 0.01; ###, *p* < 0.001), or antagonist plus agonist over the agonist treatment (*E*; ###, *p* < 0.001).

blocked by the antagonist of the partner receptor (Fig. 4, *C–E*). In addition, HU-308 (but not LPI) blocked the FK-induced cAMP increase (Fig. 5*A*), an effect that was sensitive to PTX but not to CTX (Fig. 5*B*). The HU308-induced effect was also prevented by coactivation with LPI (negative cross-talk) and not only by a CB₂R antagonist but also by a GPR55 antagonist (cross-antagonism) (Fig. 5*A*). The negative cross-talk and cross-antagonism were also observed in the activation of ERK-1/2 (Fig. 5, *C–E*). Collectively, these findings support the existence of CB₂R-GPR55 heteromers in cancer cells and show that these macromolecular structures have specific signaling properties.

Differential Effects of THC in HEK293 Cells Expressing CB₂R-GPR55 Heteromers or the Single Receptors—Next, we analyzed the signaling response of HEK293 and cancer cells to the can-

nabinoid agonist THC. In agreement with previous observations (3), THC dose-dependently reduced FK-increased cAMP levels (Fig. 6*A*) and enhanced ERK-1/2 phosphorylation (Fig. 6*B*) in HEK-CB₂ cells. Interestingly, in HEK-CB₂-GPR55 cells, a biphasic response was observed in both readouts. Although low concentrations of THC decreased FK-induced cAMP, higher THC concentrations attenuated this effect (Fig. 6*C*). Analogously, low concentrations of THC increased ERK-1/2 phosphorylation, whereas higher concentrations reduced this response (Fig. 6*D*). In support of the notion that these two-phase effects of THC are distinctive of the heteromers, we observed that the U-shaped curve in the cAMP assays (Fig. 6*E*) and the bell-shaped curve in the ERK-1/2 activation data (Fig. 6*F*) became flattened when cells were pretreated with either a CB₂R or a GPR55 antagonist. From these observations, we

CB₂R-GPR55 Heteromers in Cancer Cells

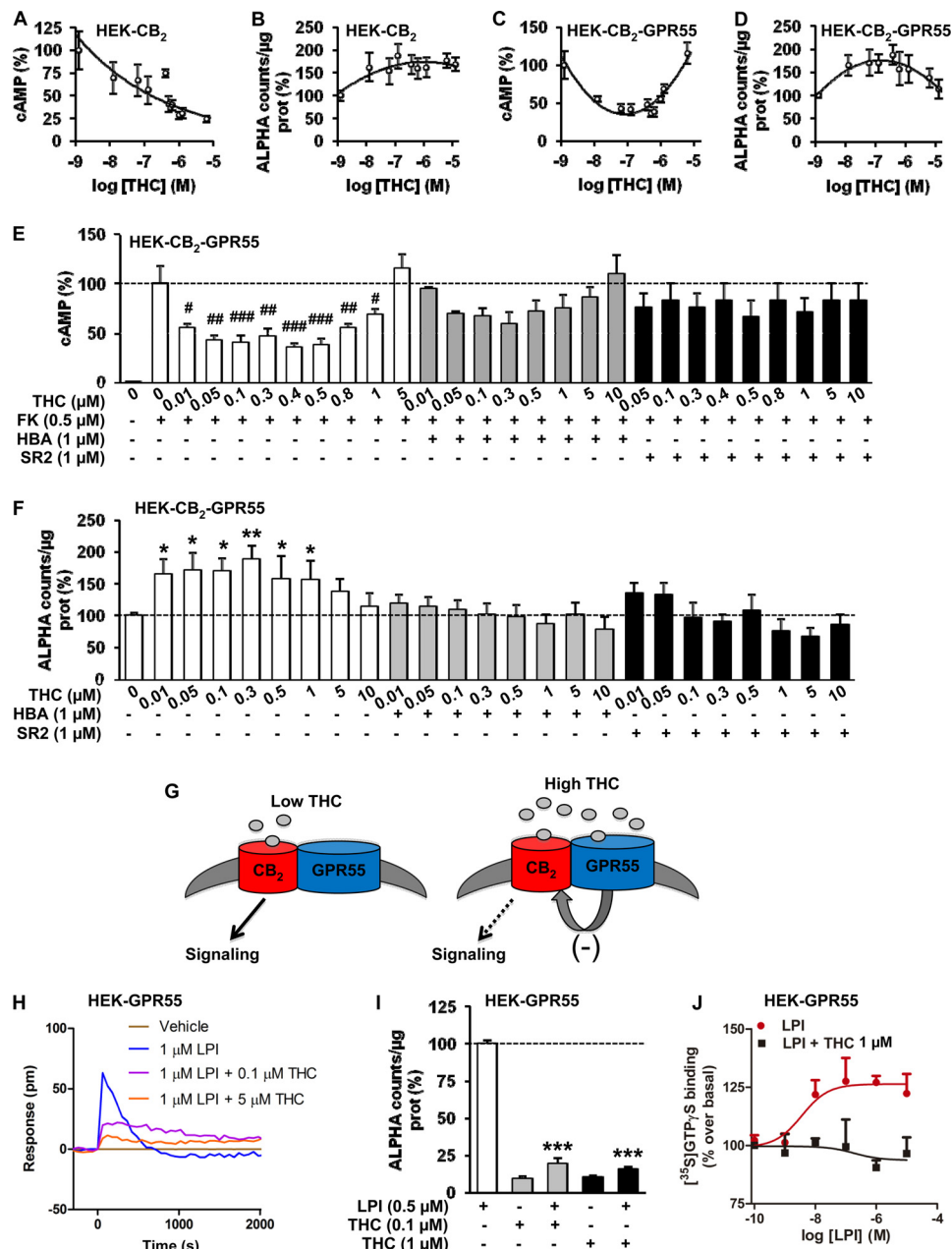


FIGURE 6. Differential effects of THC in HEK293 cells expressing CB₂R-GPR55 heteromers or the single receptors. A–F, cAMP production in the absence or presence of FK (A, C, and E) and ERK-1/2 phosphorylation (B, D, and F) in response to increasing concentrations of THC in HEK-CB₂ (A and B) and HEK-CB₂-GPR55 (C–F) cells. E and F, cells were pretreated with vehicle or the antagonists SR2 or HBA. Phosphorylation was expressed in arbitrary units (ALPHA counts, light emission at 520–620 nm). Values are mean ± S.E. of *n* = 5–12 and are expressed as a percentage of FK-treated cells (A, C, and E) or of vehicle-treated cells (B, D, and F). One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test showed a significant effect over the effect of FK (E; #, *p* < 0.05; ##, *p* < 0.01; ###, *p* < 0.001) or over vehicle-treated cells (F; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01). G, schematic of the hypothesized effect of THC on CB₂R-GPR55 heteromers. At low concentrations, THC acts as a CB₂R agonist promoting signaling. At higher concentrations, THC targets GPR55, acting as an antagonist. Via cross-antagonism through the heteromer, high THC concentrations inhibit CB₂R signaling. H–J, DMR responses (H), ERK-1/2 phosphorylation (I), and GTPγS binding (J) in HEK-GPR55 cells in response to LPI and in the absence or presence of THC (J, 1 μM). H, the resulting picometer (*pm*) shifts of reflected light wavelength versus time were monitored. Each curve is the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicate. I, phosphorylation was expressed in arbitrary units (ALPHA counts, light emission at 520–620 nm). Values are mean ± S.E. of *n* = 4–6 and are expressed as a percentage relative to the effect of LPI. One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc tests showed a significant (***) effect over the LPI effect. J, [³⁵S]GTPγS binding was expressed as the percentage over basal, and values are mean ± S.E. of *n* = 3, each one run in triplicate.

hypothesize the following mechanistic explanation for the biphasic action of THC (Fig. 6G). At low concentrations, THC (a well reported CB₂R agonist) signals through CB₂R, producing a conceivable activation of ERK-1/2 and inhibition of FK-induced cAMP increase (Fig. 6G). At higher concentrations, THC is able to target GPR55, acting as a receptor antagonist, as

suggested previously in Ref. 25, and exerting a cross-antagonism over CB₂R through the heteromer, which would result in an attenuation of the CB₂R-mediated effects on ERK-1/2 activation and cAMP production (Fig. 6G). In support of this idea, THC (which was not able to induce either DMR signals or ERK-1/2 phosphorylation in cells only expressing GPR55) decreased

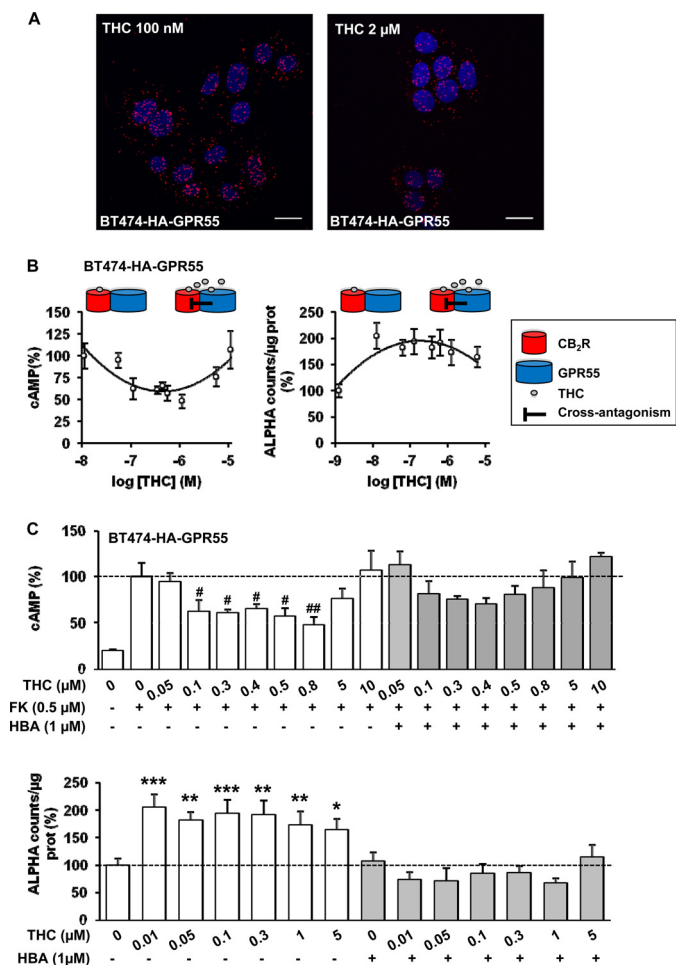


FIGURE 7. Involvement of CB₂R-GPR55 heteromers in the response of transfected cancer cells to THC. *A*, representative results of *in situ* PLAs performed in BT474-HA-GPR55 cells treated (30 min) with high and low THC concentrations. In the confocal microscopy images (*superimposed sections*), heteromers appear as *red spots*. Cell nuclei were stained with DAPI (*blue*). Scale bars = 20 μm. *B*, the effect of THC on FK-induced cAMP production (*left panel*) and ERK-1/2 phosphorylation (*right panel*) in BT474-HA-GPR55 cells. Schematics depict the hypothesized THC mechanism of action. *C*, cAMP production (*top panel*) and ERK-1/2 phosphorylation (*bottom panel*) in BT474-GPR55 cells pretreated with vehicle or the GPR55 antagonist HBA prior to stimulation with THC. *Top panel*, cells were incubated in the absence or presence of 0.5 μM forskolin. Phosphorylation was expressed in arbitrary units (ALPHA counts, light emission at 520–620 nm). Values are mean ± S.E. of *n* = 5–12 and are expressed as a percentage of FK-treated cells (cAMP determination) or of vehicle-treated cells (ERK-1/2 phosphorylation). One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed a significant effect over the effect of FK (#, *p* < 0.05; ##, *p* < 0.01) or over vehicle-treated cells (*F*; *, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001).

LPI-induced DMR responses (Fig. 6*H*) and ERK-1/2 activation (Fig. 6*J*) in HEK-GPR55 cells. The capability of THC to prevent LPI-induced activation of GPR55 was further confirmed by GTPγS binding assays. LPI produced a marked increase in [³⁵S]GTPγS binding in HEK-GPR55 membranes ($E_{\max} = 129 \pm 2\%$; $EC_{50} = 7.1 \pm 3.4$ nM), an effect that was completely blocked by coinubation with THC (Fig. 6*J*). Together, these results indicate that, at high concentrations, THC actually behaves as a GPR55 antagonist.

Involvement of CB₂R-GPR55 Heteromers in the Response of Cancer Cells to THC—We then went back to cancer cells to challenge this hypothesis. First, PLA experiments showed that neither low nor high THC concentrations disrupt the CB₂R-

GPR55 heteromers (Fig. 7*A*). Second, as in HEK-CB₂-GPR55 cells, a two-phase effect of THC was observed in BT474-GPR55 cells on the modulation of both cAMP levels and ERK-1/2 phosphorylation, in which the response found at low concentrations was attenuated at higher concentrations (Fig. 7*B*). The U-shaped curve in the cAMP assays and the bell-shaped curve in the ERK-1/2 activation became less pronounced or even flattened when BT474-GPR55 cells were pretreated with the GPR55 antagonist HBA (Fig. 7*C*), demonstrating that the antagonistic effect of THC on GPR55 modulates CB₂R signaling through CB₂R-GPR55 heteromers.

Our hypothesis was further corroborated in T98G cells, a human glioblastoma cell line that endogenously expresses both CB₂R (26) and GPR55 (12). By PLA, we detected red spots corresponding to CB₂R-GPR55 heteromers (Fig. 8*A*, *top left panel*). Treatment of cells with either low or high concentrations of THC did not alter this staining (Fig. 8*A*, *top panels*), suggesting that the heteromers are not disrupted by the cannabinoid. The CB₂R-GPR55 complexes were not detected in the negative controls, in which one of the primary antibodies was omitted, or in T98G cells, in which CB₂R (*T98G-shCB₂*) or GPR55 (*T98G-shGPR55*) expression was silenced (Fig. 8*A*, *bottom panels*). As in transfected cells, a two-phase effect of THC was observed in T98G cells on the modulation of both cAMP levels and ERK-1/2 phosphorylation, in which the response found at low concentrations was attenuated at higher concentrations (Fig. 8*B*). Finally, we analyzed the strength of our hypothesis in an *in vivo* setting. Subcutaneous tumors were generated by injection of T98G cells into athymic male mice. Tumors increased their growth slightly in response to a low THC dose (although no statistical differences were observed), whereas a higher THC dose produced the opposite effect, *i.e.* a significant reduction in tumor growth (Fig. 8*C*). According to our hypothesis, the low-dose effect would be produced mainly via activation of CB₂R and the high-dose effect via cross-antagonism of CB₂R upon targeting of GPR55. The direct antagonism of GPR55, a receptor that has been shown previously to drive tumorigenesis (12–14), by THC may contribute to this strong antitumoral response. Supporting the idea that GPR55 behaves as a tumor growth brake when targeted by high doses of THC, we observed that GPR55-silenced tumors increased their growth when exposed to THC (Fig. 8*C*). The differential effects of THC on tumor growth occurred in concert with differential changes in the levels of activated ERK-1/2, *i.e.* a reduction when CB₂R and GPR55 were coexpressed and an enhancement when GPR55 was silenced (Fig. 8, *D* and *E*). These results support our hypothesis and suggest that the well established cannabinoid target CB₂R, as well as GPR55, coparticipate, in part via direct receptor-receptor interaction, in the control of tumor growth in response to THC.

DISCUSSION

The findings reported in this study lead to three important conclusions regarding the role of cannabinoids and their cognate receptors. First, we demonstrate the existence and function of CB₂R-GPR55 heteromers in cancer cells. Second, we show that the expression of these receptor heteromers has a major impact on cannabinoid signaling in these cells. Finally,

CB₂R-GPR55 Heteromers in Cancer Cells

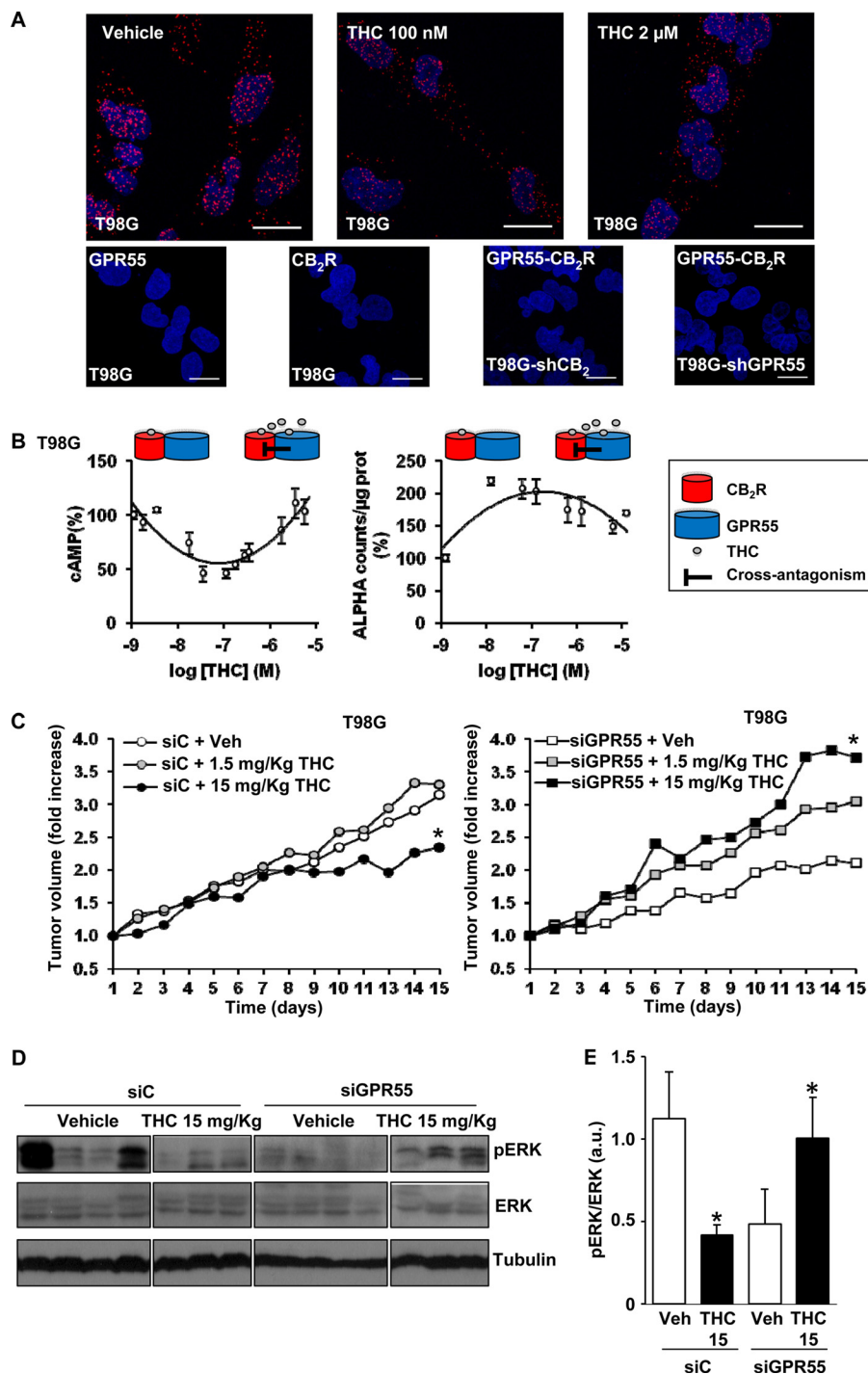


FIGURE 8. Involvement of CB₂R-GPR55 heteromers in the response to THC of cancer cells endogenously expressing CB₂R and GPR55. *A*, top panels, representative results of *in situ* PLAs performed in T98G cells treated (30 min) with vehicle and low and high THC concentrations. In the confocal microscopy images (*superimposed sections*), heteromers appear as *red spots*. Cell nuclei were stained with DAPI (*blue*). *Bottom panels*, as negative controls, PLAs were performed in T98G cells in the absence of anti-CB₂R antibody (*GPR55*) or anti-GPR55 antibody (*CB₂R*) or in the presence of anti-GPR55 and anti-CB₂R antibodies in T98G cells in which CB₂R (*T98G-shCB₂*) or GPR55 (*T98G-shGPR55*) was silenced. Scale bars = 20 μ m. *B*, FK-induced cAMP production (*left panel*) and ERK-1/2 phosphorylation (*right panel*) in T98G cells in response to THC. Schematics depict the hypothesized THC mechanism of action. *C*, the volume of subcutaneous tumors generated by injection of T98G cells in immunodeficient mice was determined. Tumors were treated with a control siRNA (*left panel*) or a GPR55-selective siRNA (*right panel*), and animals received the indicated doses of THC or the corresponding vehicle (*Veh*). Tumor growth curves were compared by ANOVA with a post hoc analysis by Student-Newman-Keuls test. *D* and *E*, Western blot analysis (*D*) and densitometric analysis (*E*) of phospho-ERK-1/2 (*pERK*) in control siRNA (*siC*) and GPR55-siRNA tumors treated with 15 mg/Kg THC. *, $p < 0.05$ versus vehicle-treated animals (*C*) or cells (*E*).

our results suggest that direct targeting of CB₂R-GPR55 via appropriate doses of THC may be an effective approach to reducing tumor growth.

Receptor heteromers involving the sister cannabinoid receptor CB₁ have been the focus of intense research. Therefore, CB₁Rs have been shown previously to interact with other G

protein-coupled receptors, including dopamine D₂ receptors (which promotes a switch in the preferential coupling from G_i to G_s) (27), D₂ receptors and adenosine A_{2A} receptors simultaneously (producing a negative modulation of D₂ receptor function by A_{2A} and CB₁R agonists) (28), opioid receptors (which produces a negative cross-talk between protomers) (29), orexin OX₁ receptors (eliciting a positive cross-talk in response to orexin and cross-antagonism) (30), and angiotensin AT₁ receptors (resulting in the potentiation of AT₁ receptor signaling) (31). More recently, coimmunoprecipitation assays in HEK293 cells have suggested that CB₁R can form heteromers with GPR55 (32). In contrast to CB₁R, very little is known about the possible existence and functional relevance of heteromers involving CB₂R. A recent study has shown that CB₂R heteromerizes with CB₁R in neuronal cells in culture and *in vivo* (19). In these systems, coactivation of both receptors results in a negative cross-talk and a bidirectional cross-antagonism (19). However, CB₂R signaling can be conceivably more relevant in non-differentiated cells, in which the receptor is highly abundant, than in terminally differentiated cells such as neurons, in which the receptor is scarce (3, 33). Specifically, CB₂R, as well as GPR55, is notably overexpressed in a wide variety of cancer cell lines and human malignant tumors (6, 11), in which they play pivotal roles in controlling cancer cell fate (6, 11–14). It is tempting to speculate that CB₂R-GPR55 heteromers may also exist and play pivotal signaling roles in other cells or tissues in which they are overexpressed, such as hematopoietic cells (16) or bones (34).

More and more studies have attempted to address the physiological role of GPR55. This receptor has been implicated in cancer, where it is generally linked with growth and proliferation (12–14). However, the molecular and cellular mechanisms behind these effects are still unanswered. In addition, it has been unclear whether GPR55's effects on proliferation involve CB₂R or are independent. Considering the receptor heteromers discussed above and knowing that CB₂R and GPR55 have been linked functionally in hematopoietic cells (16), we pursued the hypothesis that CB₂R-GPR55 heteromers might play a role in the effects of GPR55 in cancer cells. Indeed, we found that these complexes were able to form in HEK293 cells and in both BT474 and T98G cancer cells and that they display a cross-talk and cross-antagonism at the level of the cAMP and p-ERK-1/2 pathways. We also found different cell signaling effects at low and high concentrations of THC and that this bimodal effect required the presence of the heteromer. Our findings that THC appears to be an antagonist of GPR55, at least at the level of cell signaling both of the single receptor and within the CB₂R-GPR55 heteromer, were particularly surprising. Previous reports have indeed suggested this (25), and the data we obtained in three different cell lines as well as in a mouse model of cancer *in vivo* support these conclusions. This is in line with the general idea that, despite the potential relationship between cannabinoid receptors and GPR55, their pharmacology is very different (8, 35).

Finally, our discovery that CB₂R-GPR55 complexes have unique pharmacological and signaling properties and are critically involved in the response of cancer cells to THC both *in vitro* and *in vivo* opens new doors to the development of com-

pounds targeting these heteromers as novel sites of intervention for future cancer studies. Our results also shed light on the possible molecular mechanisms underlying the well known but still poorly understood biphasic effects of cannabinoids, which have been reported for several decades regarding their action on food intake, motor behavior, and anxiety, among others (36–38).

Acknowledgments—We thank Dr. Nariman Balenga and Dr. Julia Kargl for generation of the HEK cell lines.

REFERENCES

- Dorsam, R. T., and Gutkind, J. S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 79–94
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., and Kobilka, B. K. (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., and Ross, R. A. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology: LXXIX: cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacol. Rev.* **62**, 588–631
- Pacher, P., Bátkai, S., and Kunos, G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 389–462
- Guzmán, M., Sánchez, C., and Galve-Roperh, I. (2002) Cannabinoids and cell fate. *Pharmacol. Ther.* **95**, 175–184
- Velasco, G., Sánchez, C., and Guzmán, M. (2012) Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 436–444
- Brown, A. J. (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 567–575
- Ross, R. A. (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 156–163
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., and Sugiura, T. (2007) Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 928–934
- Pertwee, R. G. (2010) Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1360–1381
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Kargl, J., Andradas, C., Brown, A. J., Irving, A., Sanchez, C., and Waldhoer, M. (2011) Minireview: recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Mol. Endocrinol.* **25**, 1835–1848
- Andradas, C., Caffarel, M. M., Pérez-Gómez, E., Salazar, M., Lorente, M., Velasco, G., Guzmán, M., and Sánchez, C. (2011) The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* **30**, 245–252
- Pérez-Gómez, E., Andradas, C., Flores, J. M., Quintanilla, M., Paramio, J. M., Guzmán, M., and Sánchez, C. (2013) The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene* **32**, 2534–2542
- Piñeiro, R., Maffucci, T., and Falasca, M. (2011) The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* **30**, 142–152
- Rozenfeld, R., and Devi, L. A. (2010) Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 124–130
- Balenga, N. A., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A. J., Heinemann, A., and Waldhoer, M. (2011) GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* **21**, 1452–1469
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A., Ford, L. A., Ross, R. A., Waldhoer, M., and Irving, A. J. (2009) The GPR55 ligand 1- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J.* **23**, 183–193
- González, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., Borycz, J., Ortiz, J., Lluís, C., Franco, R., McCormick, P. J., Volkow, N. D., Rubinstein, M., Floran, B., and Ferré, S. (2012) Dopamine D4 recep-

- tor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol. Psychiatry* **17**, 650–662
19. Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., Mallol, J., Casadó, V., Lanciego, J. L., Franco, R., Lluís, C., Canela, E. I., and McCormick, P. J. (2012) Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J. Biol. Chem.* **287**, 20851–20865
 20. Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* **5**, 727–733
 21. Söderberg, O., Leuchowius, K. J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L. G., and Landegren, U. (2008) Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* **45**, 227–232
 22. Trifilieff, P., Rives, M. L., Urizar, E., Piskorowski, R. A., Vishwasrao, H. D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., and Javitch, J. A. (2011) Detection of antigen interactions *ex vivo* by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *BioTechniques* **51**, 111–118
 23. Schröder, R., Janssen, N., Schmidt, J., Kebig, A., Merten, N., Hennen, S., Müller, A., Blättermann, S., Mohr-Andrä, M., Zahn, S., Wenzel, J., Smith, N. J., Gomez, J., Drewke, C., Milligan, G., Mohr, K., and Kostenis, E. (2010) Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat. Biotechnol.* **28**, 943–949
 24. Mato, S., Vidal, R., Castro, E., Díaz, A., Pazos, A., and Valdizán, E. M. (2010) Long-term fluoxetine treatment modulates cannabinoid type 1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in the rat prefrontal cortex through 5-hydroxytryptamine 1A receptor-dependent mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **77**, 424–434
 25. Anavi-Goffer, S., Baillie, G., Irving, A. J., Gertsch, J., Greig, I. R., Pertwee, R. G., and Ross, R. A. (2012) Modulation of L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *J. Biol. Chem.* **287**, 91–104
 26. Lorente, M., Torres, S., Salazar, M., Carracedo, A., Hernández-Tiedra, S., Rodríguez-Fornés, F., García-Taboada, E., Meléndez, B., Mollejo, M., Campos-Martín, Y., Lakatos, S. A., Barcia, J., Guzmán, M., and Velasco, G. (2011) Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death Differ.* **18**, 959–973
 27. Marcellino, S., Attar, H., Lièvremon, D., Lett, M. C., Barbier, F., and Lagarde, F. (2008) Heat-treated *Saccharomyces cerevisiae* for antimony speciation and antimony(III) preconcentration in water samples. *Anal. Chim. Acta* **629**, 73–83
 28. Navarro, G., Ferré, S., Cordomi, A., Moreno, E., Mallol, J., Casadó, V., Cortés, A., Hoffmann, H., Ortiz, J., Canela, E. I., Lluís, C., Pardo, L., Franco, R., and Woods, A. S. (2010) Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* **285**, 27346–27359
 29. Rios, C., Gomes, I., and Devi, L. A. (2006) μ Opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neurogenesis. *Br. J. Pharmacol.* **148**, 387–395
 30. Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S., and Milligan, G. (2006) Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J. Biol. Chem.* **281**, 38812–38824
 31. Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M. P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., and Devi, L. A. (2011) AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* **30**, 2350–2363
 32. Kargl, J., Balenga, N., Parzmair, G. P., Brown, A. J., Heinemann, A., and Waldhoer, M. (2012) The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55. *J. Biol. Chem.* **287**, 44234–44248
 33. Pertwee, R. G. (2009) Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 397–411
 34. Whyte, L. S., Ryberg, E., Sims, N. A., Ridge, S. A., Mackie, K., Greasley, P. J., Ross, R. A., and Rogers, M. J. (2009) The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function *in vitro* and bone mass *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 16511–16516
 35. Rempel, V., Volz, N., Gläser, F., Nieger, M., Bräse, S., and Müller, C. E. (2013) Antagonists for the orphan G-protein-coupled receptor GPR55 based on a coumarin scaffold. *J. Med. Chem.* **56**, 4798–4810
 36. Moreira, F. A., and Wotjak, C. T. (2010) Cannabinoids and anxiety. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **2**, 429–450
 37. Sañudo-Peña, M. C., Romero, J., Seale, G. E., Fernandez-Ruiz, J. J., and Walker, J. M. (2000) Activational role of cannabinoids on movement. *Eur. J. Pharmacol.* **391**, 269–274
 38. Sulcova, E., Mechoulam, R., and Fride, E. (1998) Biphasic effects of anandamide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **59**, 347–352



**4. RESUMEN DE
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN**

Relevancia de la heteromerización de receptores

Los GPCRs por sí mismos pueden actuar como proteínas de andamiaje no solo para proteínas G heterotriméricas sino para otras proteínas capaces de inducir vías de señalización independientes de proteína G, así como proteínas reguladoras de su actividad. Desde finales de los años noventa se han descrito un creciente número de interacciones de los GPCRs entre sí, y de éstos con otros receptores. La estimulación de los GPCRs provoca la activación de distintas vías de señalización intracelulares que interactúan con otras vías formando una red compleja que regula un gran número de procesos celulares. La heteromerización de GPCRs provee una diversidad que no se podría conseguir con los receptores individuales.

La oligomerización es una característica genérica de los receptores de membrana, compartida por los GPCRs. Constituye un proceso común en la biología de estos receptores y hoy en día se conoce su implicación tanto en ontogenia (maduración y transporte) como en internalización, además de ser un proceso clave para la modulación de la transducción de señales y la regulación dinámica inducida por la unión de ligandos. Los GPCRs constituyen aproximadamente un 45% de las dianas de los fármacos comercializados en la actualidad y siguen siendo el foco principal de la investigación biomédica y de los programas de desarrollo de nuevos fármacos. Aún así, el problema clave sigue siendo la falta de selectividad de los ligandos, la gran cantidad de mensajeros secundarios y la enorme variedad de procesos que se ven modulados por la estimulación de un mismo GPCR, además dependiendo de su localización o interacción con otros receptores o proteínas. Los heterómeros de receptores, con propiedades bioquímicas y funcionales demostrablemente diferentes a las de sus componentes individuales, constituyen un nuevo tipo de diana farmacológica. Un ejemplo de fármaco comercializado en la actualidad y basado en la formación de heterómeros de receptores es el ligando dual eluxadolina, agonista de los receptores μ -opioides y antagonista de los receptores δ -opioides (Fujita et al., 2014). Su desarrollo se ha basado en el descubrimiento de que el bloqueo de los receptores δ -opioides disminuye la tolerancia a los efectos analgésicos del agonista más conocido de los receptores μ -opioides, la morfina. El fármaco se comercializa en Estados Unidos bajo el nombre de Viberzi® desde mediados de 2015 y la Agencia Europea del Medicamento ha aprobado la comercialización del fármaco en Europa, donde estará disponible como Truberzi® en 2017.

En este contexto, los resultados presentados en esta Tesis muestran la importancia de la oligomerización de GPCRs en diversos procesos patológicos como son la adicción, la enfermedad de Huntington y el cáncer. La Tesis se focaliza en los sistemas cannabinoide y orexinérgico, ambos con un marcado papel modulador en un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

La respuesta adecuada de un animal a los *inputs* ambientales requiere de la coordinación de múltiples funciones fisiológicas. Por ejemplo, un ratón en busca de alimento necesita permanecer alerta, hambriento, físicamente activo y presentar cierto tono simpático (presión sanguínea, frecuencia cardíaca, tasa metabólica...). Estudios anatómicos y fisiológicos han puesto de manifiesto la naturaleza multifuncional del sistema orexinérgico, cuyas neuronas parecen bien posicionadas para coordinar muchas de las citadas funciones fisiológicas (Leonard and Kukkonen, 2014; Li et al., 2014). De hecho, del mismo modo que las neuronas dopaminérgicas, las neuronas orexinérgicas constituyen un componente importante del circuito que es activado en el estado de alerta al proyectar de manera

importante hacia las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe, las noradrenérgicas del LC y las histaminérgicas del TMN, además de estar implicadas en la respuesta al estrés, los efectos reforzadores de la comida y el abuso de sustancias, entre otros. En este sentido, las orexinas promueven la motivación y las respuestas operativas frente a reforzadores positivos como la comida y las drogas de abuso.

El papel típicamente asociado al sistema orexinérgico es el de regulador de múltiples procesos fisiológicos (Leonard and Kukkonen, 2014; Li et al., 2014). Aunque poco estudiada a nivel de los receptores OX_1 y OX_2 , no hay duda de que la oligomerización constituye un mecanismo de regulación de orden superior. La idea de que un amplio abanico de ligandos pueda modular a través de la heteromerización a los GPCRs para los cuales se les ha considerado *a priori*, que no son afines, ofrece un nuevo y prometedor escenario a nivel de desarrollo farmacológico. En esta Tesis se ha estudiado la implicación molecular y estructural de los heterómeros que contienen el receptor OX_1 en un contexto patológico de adicción a comida y adicción a anfetamina como ejemplo de droga de abuso.

Interacción entre receptores de orexina, leptina y grelina

Una recompensa es un estímulo emocional positivo con características de refuerzo, es decir, que promueve una respuesta repetitiva con el objetivo de volverlo a obtener. En humanos y animales los desórdenes emocionales y la adicción se asocian a alteraciones importantes del conocido como circuito de recompensa, que en condiciones normales dirige la atención hacia el consumo de los reforzadores naturales para asegurar la supervivencia. Históricamente, las regiones cerebrales que conforman este circuito han sido asociadas con funciones comportamentales específicas; hoy en día sabemos que en realidad se trata de un circuito complejo con múltiples conexiones recíprocas, y que las regiones que lo conforman presentan límites difusos, todas ellas colaborando en la regulación emocional y los comportamientos cognitivos. La comunicación mejor caracterizada en el circuito de recompensa es la proyección dopaminérgica del VTA hacia el NAc, crucial en el reconocimiento de las recompensas en el ambiente (tanto apetitivas como aversivas) así como para el inicio de su consumo. La búsqueda de recompensas, incluyendo la búsqueda de alimentos de alta palatabilidad y de drogas de abuso, está controlada por estímulos condicionados y la dopamina en el sistema mesocorticolímbico se relaciona positivamente con el aprendizaje de estos comportamientos relacionados con recompensas. Aunque sigue sin dilucidarse el mecanismo neuroquímico por el cual estos estímulos son capaces de activar el sistema dopaminérgico, no cabe duda de la importancia de dichas proyecciones hacia la corteza prefrontal y estructuras límbicas sub-corticales como el LH. Como se ha comentado anteriormente, de los *inputs* neuronales que llegan al VTA procedentes del LH, el 20% presentan inmuno-reactividad para orexina (Balcita-Pedicino and Sesack, 2007) además de proyectar también a otras regiones que forman parte de la vía mesolímbica de la recompensa. Aquí, las orexinas se relacionan principalmente con la motivación por estímulos condicionados, realizándola frente a la búsqueda de reforzadores, y el papel clave del receptor OX_1 se ha puesto de manifiesto en diversos estudios (Aston-Jones et al., 2010; Sakurai, 2014). De hecho, el bloqueo de este receptor previene la capacidad de los estímulos contextuales o discretos de provocar la recaída a los comportamientos de búsqueda de drogas o comida.

En el contexto de control de la ingesta, interacciones entre las orexinas, la “hormona del hambre” grelina y la “hormona de la saciedad” leptina, han sido descritas en el núcleo ARC

hipotalámico (Kohno et al., 2008). Sabemos que las neuronas diana para las orexinas en el núcleo ARC se superponen ampliamente con las dianas de la grelina y la leptina, de manera que las neuronas que contienen NPY son reguladas de manera directa y cooperativa tanto por grelina y orexina como por leptina. Por otra parte sabemos que sus receptores comparten además sus áreas de expresión a nivel de SNC, principalmente en las neuronas del núcleo ARC hipotalámico considerado el principal centro de integración y control de la ingesta y la homeostasis energética. Teniendo en cuenta las interacciones previamente reportadas, se sugiere la posibilidad de mutua regulación tanto a nivel funcional como de expresión. Mientras que las interacciones a nivel de péptidos han sido ampliamente estudiadas y el circuito de control de la ingesta en el núcleo ARC parece de notable aceptación, los fundamentos moleculares no se conocen. En esta Tesis se describe por primera vez la interacción directa entre los receptores de orexina OX_1 , de grelina GHS-R1a y de leptina LEP y se realiza la caracterización funcional de los distintos complejos heteroméricos.

En la publicación titulada “*Orexin A modulates leptin receptor-mediated signaling by an allosteric modulation mediated by the ghrelin GHS-R1a receptor in hypothalamic neurons*” se describe por primera vez la formación de heterómeros entre los receptores de leptina LEP y de grelina GHS-R1a. Mediante experimentos de inmunocitoquímica se observa que ambos receptores co-localizan a nivel intracelular y de membrana plasmática; la interacción directa se confirma mediante experimentos de transferencia de energía por resonancia así como mediante la técnica de PLA en células co-transfectadas con ambos receptores. La posterior caracterización funcional del heterómero de receptores permite describir un fenómeno de *crossstalk* negativo del receptor LEP sobre el receptor GHS-R1a, es decir, que la co-activación de ambos receptores resulta en una señal menor a la esperada si tenemos en cuenta la señal obtenida a partir de la activación de cada receptor individualmente, tanto a nivel de Ca^{2+} intracelular y fosforilación de ERK1/2 como en ensayos de redistribución dinámica de masa, que tienen en cuenta principalmente la señalización a través de proteína G. Estos resultados sugieren que estas interacciones son importantes para entender el efecto de grelina y leptina en el núcleo ARC hipotalámico y sugieren, asimismo, un mecanismo de regulación entre dos señales opuestas, como son los efectos anorexigénicos de la leptina y orexigénicos de la grelina a nivel de SNC.

En esta publicación se describe también por primera vez la formación de heterómeros entre los receptores de grelina GHS-R1a y de orexina OX_1 en células vivas, mediante ensayos de BRET² y PLA. Su caracterización funcional sugiere un *crossstalk* negativo en las diferentes vías de señalización analizadas, tanto a nivel de Ca^{2+} intracelular y fosforilación de ERK1/2 como en ensayos de redistribución dinámica de masa. Aún tratándose de un sistema de expresión heteróloga, el *crossstalk* negativo observado entre agonistas constituye un posible nivel adicional de regulación molecular entre ambos receptores. A nivel fisiológico, los resultados sugieren la existencia de un mecanismo que evita una respuesta excesiva teniendo en cuenta que ambos sistemas inducen en última instancia un aumento de la ingesta. En efecto, dado que los niveles de orexinas tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo son más elevados durante el día y contribuyen a sostener la vigilia, el estado de alerta y la motivación por encontrar y consumir alimento, podrían estar por una parte incentivando la motivación por conseguir alimento y por otra, regulando el consumo al bloquear el receptor GHS-R1a a través de la formación del heterómero de receptores GHS-R1a- OX_1 .

Asimismo, en esta publicación se describe la formación del heterómero de receptores LEP- OX_1 mediante experimentos de BRET² y PLA en células HEK293T. La caracterización funcional del heterómero muestra resultados cualitativamente diferentes a los obtenidos

para los complejos heterodiméricos GHS-R1a-OX₁ y GHS-R1a-LEP, de manera que el efecto de la orexina A a nivel de liberación de Ca²⁺ intracelular, fosforilación de ERK1/2 y redistribución dinámica de masa no se ve significativamente modificado en presencia del agonista del otro receptor del complejo, en este caso de leptina.

Además, mediante técnicas biofísicas hemos confirmado que existe un mayor nivel de complejidad y por tanto de regulación. Experimentos de inmunocitoquímica en células co-transfectadas con el receptor de grelina GHS-R1a fusionado a la hemiproteína C-YFP y con el receptor de orexina OX₁ fusionado a la hemiproteína N-YFP permiten, en primer lugar, la detección del heterómero de receptores GHS-R1a-OX₁, al detectar la fluorescencia de la proteína YFP resultado de la complementación de ambas hemiproteínas. Por otra parte, la co-localización observada al co-transfectar además el receptor de leptina LEP-RLuc sugiere que los tres receptores pueden interactuar formando complejos macromoleculares en células vivas. Efectivamente, mediante experimentos de SRET se demuestra por primera vez que los tres receptores - GHS-R1a, LEP y OX₁ - son capaces de interactuar formando complejos heterotriméricos en células vivas. La formación de un complejo macromolecular conteniendo tres receptores distintos permite la expansión de la diversificación tanto farmacológica como funcional, pudiéndose describir los mismos acontecimientos que en el caso de los heterodímeros; así, el perfil farmacológico de un receptor puede cambiar al activarse otro receptor del complejo y la señalización asociada dependerá del grado de activación, de las vías en respuesta y de la naturaleza de las proteínas G expresadas en el plano horizontal en el caso de los GPCRs (Terrillon and Bouvier, 2004). Los resultados descritos en la Tesis demuestran un *crossstalk* en células que expresan dos de los receptores y que se ve alterado por la expresión del tercer receptor. Además, en cultivos primarios de hipotálamo se observan propiedades de señalización similares a las reportadas en células HEK-293T que co-expresan los tres receptores, sugiriendo que en neuronas se expresa el heterotrimero y es funcional. En el complejo descrito, en el que se asocian dos receptores tipo GPCR y un receptor de citoquinas, el estudio de la fosforilación de ERK1/2, la liberación de Ca²⁺ intracelular y la redistribución dinámica de masa mediante ensayos *label free* muestra características diferenciales específicas. Efectivamente, la presencia del receptor de orexina OX₁ en el complejo evita el bloqueo del receptor LEP sobre el receptor GHS-R1a, permitiendo su señalización, mientras que en presencia del receptor LEP no se observa el *crossstalk* negativo descrito para el heterómero de receptores OX₁-GHS-R1a.

La capacidad de interactuar con otros GPCRs ha sido previamente estudiada en el caso del receptor GHS-R1a. Así, se han descrito gran cantidad de complejos heteroméricos, desde interacciones con receptores de dopamina D₁ y D₂ (Kern et al., 2012; Schellekens et al., 2013), implicados en la señalización de los circuitos de recompensa a la comida, hasta interacciones con los receptores de melanocortina MC₃ (Rediger et al., 2011), neurotensina NTS₁R (Takahashi et al., 2006) o somatostatina sst₅ (Park et al., 2012). Por lo que respecta al receptor OX₁, aunque desde el punto de vista de la biología de los heterómeros de receptores y la farmacología ha atraído menos atención, se ha descrito la interacción con el receptor cannabinoide CB₁ (Ellis et al., 2006) y con el receptor del factor liberador de corticotropina CRF₁ (Navarro et al., 2015a), ambos complejos relacionados con mecanismos de recompensa.

Por su parte, la versión clásica sobre la estructura y el mecanismo de activación del receptor LEP muestra que los receptores existen como dímeros, estabilizados mediante puentes disulfuro entre los dominios extracelulares *cytokine receptor homology 2* (CRH2) (Peelman et al., 2006). La leptina induce un cambio conformacional de su receptor y la formación de *clusters* en la superficie celular compuestos por dímeros ya preformados, de manera que se forman

complejos de dos moléculas de leptina y cuatro del receptor LEP (dos dímeros). Este tetrámero es capaz de señalizar al interior celular por asociación de dos proteínas JAK2 que se encuentran suficientemente próximas. Aún así, hay estudios difíciles de reconciliar con el modelo del tetrámero, que muestran que dos moléculas de receptor son necesarias y suficientes para promover la activación de STAT (Bahrenberg et al., 2002), siendo la isoforma LEPa un dominante negativo en la señalización de la isoforma larga LEPb. Teniendo en cuenta el modelo tetramérico, la co-expresión de un exceso de LEPa sin efectos en la activación de la vía JAK/STAT mediada por LEPb, puede explicarse mediante la formación de un tetrámero formado por un dímero de LEPb y otro de LEPa (Bacart et al., 2010). El descubrimiento de la heteromerización entre isoformas del receptor de leptina abre la puerta a la posibilidad de que se den interacciones con otros receptores. De hecho se ha reportado la formación de complejos heteroméricos entre GPCRs y receptores tirosina quinasa (RTK) y receptores de citoquinas. Es el caso del heterómero formado por el receptor *fibroblast growth factor 1* (FGF1) y el receptor de serotonina 5-HT1A (Borroto-Escuela et al., 2016), en el que el tratamiento combinado con los agonistas de ambos receptores induce la formación de los heterocomplejos e incrementa la señalización del receptor FGF1. Hoy en día se acepta la formación de heterocomplejos entre GPCRs y RTKs, las dos mayores familias de receptores de membrana, y su importancia en la regulación de la señalización, reconocimiento, tráfico intracelular y fenómenos de sensibilización/desensibilización (Borroto-Escuela et al., 2016). El receptor LEP comparte estructura, mecanismo de activación y vías de señalización con los receptores RTK, si bien, a diferencia de ellos no tiene actividad tirosina quinasa intrínseca sino que su activación depende de la asociación con proteínas con dicha actividad. La heteromerización, pues, es también un proceso común en la biología de los receptores de citoquinas, sugiriendo la posible interacción molecular con otros receptores de membrana como los GPCRs.

La formación de los heterómeros de receptores descritos en esta publicación concuerda, pues, con la reportada capacidad de interacción de los tres receptores aquí estudiados y sugiere que dicha interacción puede modular y/o alterar la señalización de los receptores individuales.

La acción del sistema orexinérgico en la estimulación de la ingesta se ve influenciada por múltiples factores, como el ciclo sueño-vigilia y la palatabilidad de los alimentos consumidos. Las orexinas, pues, no solo aumentan la ingesta de manera indiscriminada (Clegg et al., 2002; Haynes et al., 1999; Yamanaka et al., 2003) sino que se presentan como moduladores de diversas funciones fisiológicas que determinan el estado de alerta y la búsqueda de alimento o de otro reforzador. Los trabajos de Kohno y colaboradores (Kohno et al., 2003, 2008) describen un efecto inhibitorio de la leptina sobre la grelina y las orexinas en las neuronas que expresan el péptido NPY (potente estimulador de la ingesta) en el núcleo ARC; concretamente, reportan la inhibición transitoria del incremento de Ca^{2+} intracelular inducido por grelina vía canales de calcio tipo N y PKA, así como la inhibición a largo plazo del mismo incremento de Ca^{2+} inducido por orexinas en estas mismas neuronas. El aumento de Ca^{2+} intracelular es un indicador de activación neuronal ya que se relaciona con la despolarización de la membrana plasmática y se le considera una señal clave para dirigir la liberación de hormonas y neurotransmisores además de la expresión génica. La inhibición descrita a este nivel se considera un posible mecanismo neuronal que permitiría la ingesta asociada al incremento en los niveles de grelina y la consecuente activación de las neuronas que expresan NPY en el núcleo ARC bajo la continua presencia de leptina (Kohno et al., 2008).

Los resultados aquí descritos para el heterómero de receptores GHS-R1a-LEP en células HEK293T concuerdan con la inhibición previamente descrita de la leptina sobre la grelina a nivel de liberación de Ca^{2+} intracelular en el núcleo ARC hipotalámico. Los resultados aparentemente difíciles de conciliar a nivel del efecto de la leptina sobre la señalización mediada por orexinas se puede deber a distintos motivos. Por una parte, en esta Tesis se ha trabajado principalmente en un sistema de expresión heteróloga como son células HEK293T transfectadas con los receptores de estudio. Por otra parte, las mediciones de calcio intracelular reportadas por Kohno y colaboradores se basan en la incubación con el marcador fluorescente fura-2, que se une al calcio libre intracelular (Kohno et al., 2008), mientras en el trabajo aquí descrito se transfecta previamente el sensor de calcio GCaMP6, que sufre cambios de conformación por unión de calcio libre que exponen el cromóforo que conforma su estructura. Además, hay que tener en cuenta que tanto la interacción de la orexina A con el receptor OX_1 así como la señalización del receptor dependiente de PLC se ven afectadas por los niveles de calcio extracelular (Leonard and Kukkonen, 2014; Putula et al., 2014). En células HEK293T co-transfectadas, observamos un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular con un máximo a los 20-30 segundos tras la activación con una única dosis de agonistas, a diferencia de Kohno y colaboradores, que administran los agonistas de manera continuada durante 40-50 minutos (Kohno et al., 2008).

Estudios de *single fluorescent-molecule video imaging* (Kasai and Kusumi, 2014) han revelado que la oligomerización de receptores es un proceso sorprendentemente dinámico de manera que las interacciones moleculares a nivel tanto de membrana plasmática como de membranas de sistemas intracelulares ocurren en cortas escalas de segundos. Es decir, que en menos de un segundo se establece un equilibrio dinámico entre asociación y disociación, entre monómeros, dímeros u oligómeros. La formación del complejo heteromérico aquí descrito sugiere que la regulación entre estos tres sistemas empieza ya a nivel de receptores, planteándose un posible escenario complejo y dinámico de interrelación entre diferentes sistemas de neurotransmisión y neuromodulación, en el que la oligomerización estaría jugando un papel capital.

Heterómero de receptores OX_1 - CRF_2 y adicción a anfetamina

Dado el papel regulador de la orexina en diversos procesos fisiológicos y, en particular, en funciones que involucran circuitos cerebrales de recompensa, nos preguntamos cuál podría ser su papel en el comportamiento adictivo, en particular en la adicción a anfetamina. Con los datos disponibles hasta el momento, se considera que las orexinas incrementan la motivación por estímulos condicionados y promueven específicamente la búsqueda de psicoestimulantes, permaneciendo intacta la habilidad de las propias drogas de actuar sobre los circuitos de la motivación y la recompensa, es decir, las orexinas no afectan a las propiedades reforzadoras de las propias drogas en sí. Y uno de los desencadenantes principales de la búsqueda de psicoestimulantes como la anfetamina es el estrés. Un estímulo estresante induce la liberación de CRF en el VTA, que desencadena un aumento en la liberación de glutamato y la activación de las neuronas dopaminérgicas en esta área, principalmente a través de la activación de receptores CRF_2 (Wang et al., 2005, 2007). Teniendo en cuenta que gran parte del glutamato liberado en el VTA procede del LHA, fuente principal de neuronas orexinérgicas, el ya comentado efecto motivante relacionado con el sistema orexinérgico y la relación de las orexinas con la respuesta al estrés mediada principalmente por CRF, se sugiere una estrecha relación entre ambos sistemas con un papel modulador en el proceso de recaída al consumo de psicoestimulantes.

En esta Tesis se han descrito interacciones funcionales significativas entre el sistema CRF y el sistema orexinérgico dependientes de la oligomerización de los receptores CRF₂ y OX₁. En la publicación “*Differential effect of amphetamine over corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, orexin receptor OX₁ and CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex*”, ensayos de inmunocitoquímica muestran la expresión predominante del receptor OX₁ a nivel de membrana plasmática mientras el receptor CRF₂ muestra mayormente una expresión intracelular además de en membrana plasmática; en las células que co-expresan ambos receptores se observa co-localización subcelular, observándose una mayor distribución del receptor CRF₂ en membrana y sugiriendo la posibilidad que ambos receptores puedan interactuar a nivel molecular. Efectivamente, mediante experimentos de BRET se han demostrado interacciones moleculares entre los receptores CRF₂ y OX₁ en un sistema de expresión heteróloga como son células HEK293T co-transfectadas con ambos receptores. Además, experimentos de señalización apoyan que los cambios conformacionales debidos a la activación de un receptor se transmiten al otro receptor. En el heterómero, este alosterismo inter-protómero se caracteriza por un *cross-talk* y un *cross*-antagonismo a nivel de cAMP, liberación de Ca²⁺ intracelular, fosforilación de ERK1/2 y ensayos de redistribución dinámica de masa, fenómenos específicos y no atribuibles a la falta de especificidad de los ligandos teniendo en cuenta que ninguno de los dos se observa en las células transfectadas únicamente con uno de los dos receptores de estudio. La habilidad del antagonista de un receptor de bloquear la señal inducida por el agonista de un segundo receptor tan solo se ha reportado en un contexto de heteromerización de GPCRs (Ferré et al., 2014). Así pues, este fenómeno se considera una huella dactilar (*fingerprint*) del complejo heteromérico y constituye una nueva herramienta para la identificación de heterómeros de GPCRs *in vivo* (Franco et al., 2016). La modulación negativa del factor CRF sobre la señalización mediada por el receptor OX₁ así como el *cross*-antagonismo bidireccional constituyen un nuevo avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a las evidencias fisiológicas descritas (James et al., 2017) entre ambos sistemas.

La anfetamina se considera un factor anoréctico (Hsieh et al., 2005) y ansiogénico (Biala and Kruk, 2007). Ante las evidencias fisiológicas descritas, quisimos estudiar qué efectos podría tener este psicoestimulante en la señalización mediada por los receptores CRF₂ y OX₁. En células HEK293T que expresan el receptor CRF₂ se observa un incremento de la señal a nivel de cAMP y ensayos de redistribución dinámica de masa previo tratamiento con anfetamina. Por su parte, en células que expresan el receptor OX₁, la señal propia de la activación del receptor se ve incrementada previo tratamiento con anfetamina a nivel de cAMP, liberación de Ca²⁺ y ensayos de redistribución dinámica de masa. En cambio, en experimentos de fosforilación de ERK1/2 no se observan diferencias significativas en células que expresan el receptor CRF₂ e incluso se observa una reducción significativa de la señal en células que expresan el receptor OX₁ comparando el tratamiento con vehículo y con anfetamina. Los resultados obtenidos muestran, pues, un efecto *biased* de la anfetamina sobre los receptores CRF₂ y OX₁, de manera que potencia las vías de señalización dependientes de proteína G de ambos receptores mientras no se observan efectos significativos a nivel de fosforilación de ERK1/2.

En células HEK293T, ensayos de inmunocitoquímica muestran como el tratamiento con anfetamina aumenta la localización en membrana plasmática del receptor CRF₂ mientras no modifica la localización subcelular del receptor OX₁. Ensayos de BRET en células que co-expresan ambos receptores muestran que la anfetamina no altera la interacción molecular entre ellos. Por su parte, el tratamiento con anfetamina mantiene el *cross*-antagonismo bidireccional y potencia el *cross-talk* negativo descrito para el heterómero de receptores

CRF₂-OX₁, a diferencia de la disrupción descrita para otro psicoestimulante, la cocaína, sobre el heterómero de receptores CRF₁-OX₁ (Navarro et al., 2015a). La potenciación de la señalización mediada por los receptores CRF₂ y OX₁ así como la exacerbación de las características específicas del heterómero de receptores CRF₂-OX₁ mediadas por anfetamina concuerdan con los efectos reforzadores y ansiogénicos de la droga, el papel descrito de las orexinas en el procesamiento de las recompensas (Borgland et al., 2006; Mahler et al., 2014; Sakurai, 2014) y la función ansiogénica descrita para el receptor CRF₂ tras la recaída en un protocolo de auto-administración de un psicoestimulante como la cocaína (Williams et al., 2014).

La anfetamina tiene al transportador DAT como diana principal implicada en sus propiedades reforzadoras y su potencial de abuso, aunque también ejerce acciones comparables a nivel de otros transportadores (Fleckenstein et al., 2007) (Véase Introducción, apartado 1.5.1. Adicción a psicoestimulantes). Otra diana de especial relevancia son los receptores sigma (σ_1 y σ_2); aunque hasta el momento no se han descrito estudios directos de la unión de anfetamina a estos receptores, sí se ha descrito que la metanfetamina y otros psicoestimulantes como la cocaína muestran una afinidad significativa por ambos receptores (Nguyen et al., 2005). Asimismo, la activación de dichos receptores se relaciona con la promoción de interacciones proteína-proteína que modulan la actividad de ciertos canales iónicos y GPCRs (Matsumoto et al., 2014). De hecho, se han descrito interacciones directas del receptor σ_1 y los receptores de dopamina D₁ (Navarro et al., 2010) (Moreno et al., 2014) y D₂ (Navarro et al., 2013) y el receptor CRF₁ (Navarro et al., 2015b), a través de las cuáles la cocaína ejerce su función moduladora. En esta Tesis se describe por primera vez la interacción directa de los receptores σ_1 y CRF₂ y de los receptores σ_2 y OX₁, que parecen subyacer a la potenciación de la señalización vía cAMP mediada por anfetamina. Mediante experimentos de BRET se observa la interacción molecular entre los receptores CRF₂ y σ_1 ; en células que co-expresan los receptores CRF₂ y OX₁, en presencia del RNA de interferencia para el receptor σ_1 no se observa la modulación inducida por anfetamina, sugiriendo que la potenciación por parte de la anfetamina de la señal de CRF a nivel de cAMP depende de la interacción física entre los receptores CRF₂ y σ_1 . Por su parte, mediante experimentos de BRET se observa la interacción molecular entre los receptores OX₁ y σ_2 ; en células que co-expresan los receptores CRF₂ y OX₁, en presencia del RNA de interferencia para el receptor σ_2 no se observa la modulación inducida por anfetamina, sugiriendo que la potenciación por parte de la anfetamina de la señal de orexina A a nivel de cAMP depende de la interacción física entre los receptores OX₁ y σ_2 .

Se ha descrito la excitación de las neuronas dopaminérgicas del VTA mediada por orexinas (Vittoz et al., 2008). La potenciación de la señalización del receptor OX₁ mediada por anfetamina y descrita en un sistema de expresión heteróloga se pudo confirmar *in vivo* mediante experimentos de microdiálisis en el VTA de ratas. Así, la liberación extracelular de dopamina y glutamato mediada por anfetamina mostró un incremento en ratas previo tratamiento con anfetamina comparado con ratas control. Además, este incremento fue bloqueado previa administración de un antagonista selectivo del receptor CRF₂. Como se ha comentado anteriormente, el fenómeno de *cross*-antagonismo se considera un *fingerprint* del complejo heteromérico y constituye una herramienta para la identificación de heterómeros de GPCRs *in vivo*. En esta Tesis se ha identificado la formación del heterómero de receptores CRF₂-OX₁ mediante este fenómeno en el VTA de ratas previo tratamiento o no con anfetamina. Estos resultados sugieren un papel relevante del heterómero de receptores CRF₂-OX₁ a nivel de liberación de dopamina y glutamato en el

VTA frente a estímulos estresantes, que pueden ser clave para entender el comportamiento asociado al consumo compulsivo de anfetamina.

En presencia de un psicoestimulante como la anfetamina, pues, se produce un aumento de la señalización propia del sistema orexinérgico, de manera que la sobre-estimulación del sistema conlleva un aumento de la motivación asociada a la búsqueda y el consumo. Esta hipótesis queda reforzada por el aumento en la liberación tanto de dopamina como de glutamato descrito a nivel de VTA. Por su parte, también induce un aumento de la señalización mediada por CRF en un sistema de expresión heteróloga, que a nivel fisiológico en un contexto de adicción a anfetamina sugiere una respuesta mayor frente a un mismo estímulo estresante, lo cual puede repercutir en una mayor tasa de recaída. El balance σ_1/σ_2 y la expresión de los heterómeros OX_1/CRF_2 en una célula determinada condiciona, pues, el efecto de la anfetamina y la señalización inducida por orexina y CRF.

Relevancia de las interacciones entre receptores de cannabinoides y adenosina en la Enfermedad de Huntington

Los cannabinoides y la adenosina son dos de los más antiguos reguladores que aparecieron en la evolución (Fredholm, 2011; Russo et al., 2008). Por este motivo los receptores de estos moduladores se consideraron a la hora de identificar heterómeros relevantes para la regulación de la transmisión nerviosa. El estriado dorsal, también conocido como caudado-putamen es el lugar en que receptores de adenosina A_{2A} se expresan en cantidades ingentes. El estriado forma parte de los ganglios basales, que constituyen un nexo importante para diversos procesos neurobiológicos, principalmente el control de la actividad motora. Teniendo en cuenta que la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington constituyen dos de los desórdenes neurodegenerativos más importantes que afectan a los ganglios basales y al control de la actividad motora, los receptores de adenosina y de cannabinoides se presentan como posibles dianas de terapias efectivas en la desaceleración de la progresión de dichas enfermedades. Actualmente, el desarrollo de fármacos selectivos para los receptores de adenosina y de cannabinoides (y sus complejos heteroméricos) es prometedor. Dada su localización en el sistema nervioso central, fármacos que actúan sobre estos receptores pueden ser útiles para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, neuropsiquiátricos y cuadros de adicción a drogas de abuso. Un ejemplo en este sentido es la aprobación en Japón en marzo de 2013 de un fármaco para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, comercializado bajo el nombre de Nourias® y que consiste en un análogo de la cafeína, la istradefilina o KW-6002, que actúa como antagonista selectivo de los receptores A_{2A} (Dungo and Deeks, 2013). Basado en la descripción del *crossstalk* negativo descrito entre los receptores D_2 y A_{2A} , que forman heterómeros, el bloqueo farmacológico de los receptores A_{2A} aumenta los efectos antiparkinsonianos derivados de la administración de L-DOPA, mejorando la función motora (Uchida et al., 2015).

Hay estudios que muestran una regulación negativa de la expresión del receptor CB_1 en el estriado dorsal tanto en pacientes de Huntington como en modelos animales de la enfermedad (Fernández-Ruiz et al., 2011; Glass et al., 2000), que reflejan un patrón característico de daño de las MSNs de la vía indirecta. Los estadios iniciales, presintomáticos, de la enfermedad se caracterizan más por la alteración en el funcionamiento que no por la muerte neuronal y dicho proceso se asocia con la regulación negativa/desensibilización de los receptores CB_1 (Blázquez et al., 2011; Denovan-Wright

and Robertson, 2000; Dowie et al., 2009; García-Arencibia et al., 2009; Glass et al., 2000; Lastres-Becker et al., 2002). De hecho, hay un efecto inhibitorio de la huntingtina mutada sobre el promotor del gen que codifica para el receptor CB₁, a través del *repressor element 1 silencing transcription factor* (Blázquez et al., 2011). Teniendo en cuenta que la señalización cannabinoide inhibe la liberación de glutamato, la regulación negativa de estos receptores se asocia con niveles elevados de glutamato y consecuentemente, excitotoxicidad. En estadios más avanzados, cuando la muerte neuronal pasa a ser el evento característico, se ha descrito una fuerte pérdida de receptores CB₁ debido a la muerte de neuronas estriatales que lo expresan y este fenómeno es compatible con los síntomas hiperkinéticos que presentan típicamente los pacientes (Pazos et al., 2008; Van Laere et al., 2010). En esta línea, son diversos los estudios que han reportado efectos neuroprotectores de ligandos cannabinoideos actuando principalmente a través de receptores CB₁; la administración de CBD y de Δ^9 -THC reduce el estrés oxidativo en modelos animales (Lastres-Becker et al., 2004; Sagredo et al., 2007), mientras que la administración de Δ^9 -THC también reduce la excitotoxicidad y previene la progresión de la enfermedad, como así lo muestran marcadores moleculares, neuropatológicos y de comportamiento (Blázquez et al., 2011). El amplio abanico de efectos farmacológicos, sean comportamentales o autónomos, atribuidos a los cannabinoideos muestran la importancia de la localización del receptor CB₁; así, el receptor CB₁ a nivel pre-sináptico, es decir, en proyecciones cortico-estriatales glutamatérgicas, se relaciona con los efectos hipolocomotores del Δ^9 -THC, mientras que sus efectos catalépticos dependen de la expresión funcional del receptor CB₁ en MSNs de la vía directa (Monory et al., 2007). Dichos efectos se reducen ante el bloqueo genético o farmacológico de receptores A_{2A} (Andersson et al., 2005).

También se ha descrito una disminución de la expresión del receptor de adenosina A_{2A} en las MSNs de la vía indirecta en el estriado dorsal tanto de pacientes de Huntington como de modelos animales de la enfermedad (Glass et al., 2000; Lee and Chern, 2014). Teniendo en cuenta los resultados *a priori* contradictorios obtenidos, los efectos de la activación o del bloqueo del receptor A_{2A} en la progresión de la enfermedad de Huntington siguen siendo fuente de debate. Estos resultados indican la posibilidad de que haya diferentes mecanismos moleculares y fisiopatológicos implicados dependiendo de la localización celular del receptor así como de su capacidad de heteromerización. Es posible que el bloqueo del receptor A_{2A} pre-sináptico (situado en las proyecciones cortico-estriatales) induzca una disminución de la liberación de glutamato y por tanto, una disminución del *output* motor evocado por la estimulación cortical, y que el bloqueo del receptor A_{2A} post-sináptico (situado en las MSNs de la vía indirecta) induzca una disminución de la liberación de GABA, y por lo tanto una estimulación indirecta del movimiento por inhibición de la vía indirecta (Orrú et al., 2011; Quiroz et al., 2009; Tebano et al., 2012). Mientras que existe una alteración funcional del receptor A_{2A} post-sináptico y una pérdida del receptor CB₁ en los estadios iniciales de la enfermedad de Huntington, la función del receptor A_{2A} pre-sináptico y la expresión del receptor CB₁ en las proyecciones cortico-estriatales no se ven afectados (Chiarlone et al., 2014; Chiodi et al., 2012; Orrú et al., 2011).

La elevada expresión de los receptores A_{2A} y CB₁ en el estriado, su co-localización a nivel de MSNs de la vía indirecta, su mutua implicación en la modulación de la actividad locomotora y los comportamientos dirigidos así como gran cantidad de evidencias farmacológicas sugieren la existencia de interacciones directas o indirectas entre ambos receptores. De hecho, hace ya una década que Carriba y colaboradores demostraron mediante la técnica de BRET la formación de heterómeros de receptores A_{2A}-CB₁ en células transfectadas y mostraron su existencia en secciones de cerebro de rata por inmunohistoquímica y microscopía confocal y en membranas de estriado mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Carriba et al., 2007). Sin embargo, la localización

precisa de estos complejos seguía siendo incierta. El trabajo titulado *Singular location and signaling profile of adenosine A_{2A} -cannabinoid CB_1 receptor heteromers in the dorsal striatum* aquí presentado provee un mapa de expresión y una caracterización funcional de los heterómeros de receptores A_{2A} - CB_1 en el estriado dorsal.

En efecto, a nivel de expresión, los ensayos sistemáticos de PLA en modelos genéticos de la enfermedad de Huntington permiten considerar desdeñable la expresión de complejos A_{2A} - CB_1 en los terminales cortico-estriatales glutamatérgicos al mismo tiempo que permiten demostrar su expresión en las MSNs de la vía indirecta. Los resultados de la Tesis indican una expresión del complejo tanto en el compartimento somatodendrítico (principal diana de los *inputs* cortico-estriatales) como en los terminales de dichas neuronas. Los resultados no permiten descartar la expresión del heterómero en otras subpoblaciones neuronales minoritarias como interneuronas GABAérgicas, interneuronas colinérgicas o astrocitos. Estos resultados sugieren una explicación distinta a la formación de heterómeros para el *cross-talk* inhibitorio reportado a nivel pre-sináptico; la implicación de ambos receptores en los efectos depresores del movimiento así como en los efectos adictivos de los cannabinoides no se debe a interacciones físicas entre ellos sino a la mediación de vías de señalización distintas, opuestas en diversos niveles, teniendo en cuenta el acoplamiento preferente del receptor A_{2A} a la proteína G_s y del receptor CB_1 a la proteína $G_{i/o}$. Otra posibilidad es la formación de heterómeros con otros receptores con los que se co-expresan, como así lo confirma la descripción del complejo A_{2A} - A_1 (Ciruela et al., 2006; Quiroz et al., 2009). En un futuro podría ser relevante estudiar la posible formación de heterómeros entre receptores A_1 , A_{2A} y CB_1 , así como estudiar su expresión en el estriado de animales modelo de la enfermedad de Huntington.

A nivel funcional, los resultados obtenidos sugieren la existencia en proyecciones cortico-estriatales y MSNs tanto de la vía directa como indirecta de diversas poblaciones de receptores A_{2A} y CB_1 según su interacción y según su acoplamiento a proteína G. Se ha demostrado el cambio en el acoplamiento preferente de proteína G de $G_s/G_{i/o}$ cuando los receptores se expresan individualmente a proteína $G_{q/11}$ en el heterómero de receptores, constituyendo una característica bioquímica única y reconocible del complejo A_{2A} - CB_1 . Este fenómeno se asocia comúnmente a la formación de heterómeros de GPCRs, de manera que la acción de un ligando sobre un protómero formando parte de un complejo oligomérico puede potenciar, atenuar o cambiar el acoplamiento a una proteína G. El ejemplo paradigmático es el *switch* observado en el heterómero de receptores D_1 - D_2 de dopamina. Así, Rashid y colaboradores demostraron mediante experimentos en cerebros de ratón WT que el receptor D_1 se acopla de manera preferente a la proteína G_s y el receptor D_2 se acopla a proteína $G_{i/o}$, mientras que el heterómero D_1 - D_2 se acopla a $G_{q/11}$ (Rashid et al., 2007). Este fenómeno se ha observado tanto en sistemas de expresión heteróloga como en neuronas estriatales en cultivo y en secciones de estriado. Otro claro ejemplo es el del heterómero de receptores CB_1 - D_2 , importante regulador de la función de los ganglios basales y atractiva diana terapéutica en desórdenes neuropsiquiátricos en los que la señalización dopaminérgica y/o cannabinoide está alterada. La co-expresión de ambos receptores da lugar a un acoplamiento del heterómero a proteína G_s en vez de a proteína $G_{i/o}$ (Kearn et al., 2005).

En el trabajo aquí presentado se estudió también la expresión del heterómero de receptores en diferentes estadios de la enfermedad de Huntington, desorden paradigmático causado por la pérdida selectiva de MSNs en el estriado dorsal y para el que se han descrito cambios de expresión y función de los receptores A_{2A} y CB_1 . Los resultados obtenidos permiten configurar un nuevo escenario para entender el papel que juega la función coordinada de los sistemas adenosinérgico y cannabinérgico concretamente en la vía indirecta en el

estriado, relevante a nivel de control motor. El análisis sistemático por PLA de modelos celulares que expresan la proteína huntingtina WT o mutada pero sin desarrollar inclusiones, compatible con estadios iniciales de la enfermedad, ha demostrado que la mera expresión de la huntingtina mutada no previene la formación del heterómero, detectable en niveles similares en ambos tipos celulares. Las características bioquímicas singulares atribuidas a la formación de dicho complejo estarían, pues, preservadas en el inicio de la enfermedad. El estudio de ratones heterocigotos para la huntingtina mutada de diferentes edades ha permitido estudiar la expresión del heterómero en diferentes estados de progresión de la enfermedad, observándose una pérdida masiva y selectiva del heterómero en el equivalente a estadios más avanzados. Los niveles de expresión de los receptores individuales se preservan, de manera que los resultados sugieren la existencia de una población de receptores A_{2A} y una población de receptores CB_1 que no están interaccionando y que pueden ser importantes desde el punto de vista farmacológico en estadios tardíos, mientras la población de heterómeros de receptores tendría un papel relevante en estadios tempranos, perdiéndose tanto su expresión como, consecuentemente, su funcionalidad singular a medida que progresa la enfermedad. Además, esta pérdida selectiva del heterómero de receptores A_{2A} - CB_1 funcional que acompaña a la progresión de la enfermedad de Huntington en modelos de ratón se ha demostrado también en cerebros humanos *post-mortem* de pacientes con diferentes grados de afectación, sugiriendo la importancia de funciones específicas asociadas a la formación de dicho complejo que se ven afectadas negativamente en estadios tardíos de la progresión de la enfermedad.

Relevancia del heterómero de receptores CB_2 -GPR55 en la señalización cannabinoide en cáncer

La habilidad protectora de los cannabinoides no se limita a desórdenes neurodegenerativos sino también a procesos oncogénicos. De hecho el sistema cannabinoide ha sido clásicamente estudiado desde dos puntos de vista, el neuroprotector y el anti-tumoral. De nuevo la heteromerización puede jugar un importante papel para entender los efectos diversos descritos para los cannabinoides. El receptor GPR55 es un receptor huérfano que se expresa en mayor o menor medida en muchas células tumorales (Leyva-Illades and Demorrow, 2013). En esta Tesis se ha investigado el potencial del heterómero de receptores CB_2 -GPR55 en diversas líneas de células tumorales y se ha realizado su caracterización bioquímica.

Tanto en las respuestas a la ansiedad como en el procesamiento motivacional, la regulación de la respuesta inmune y de los comportamientos relacionados con la ingesta de comida o con la búsqueda de drogas de abuso, la actividad cannabinoide responde a un comportamiento bimodal en función de la dosis. Los efectos bifásicos del Δ^9 -THC se describieron ya en 1977, cuando Taylor y Fennessy reportaron que la inyección de Δ^9 -THC en ratas inducía cambios bifásicos en comportamiento, temperatura corporal y niveles de 5-hidroxitriptamina (5-HIAA) en cerebro (Taylor and Fennessy, 1977). Mientras que los cambios relativos al comportamiento no los pudieron asociar a un fenómeno dosis-dependiente, sí que constataron la hipertermia inducida por dosis bajas de Δ^9 -THC y la hipotermia a dosis más elevadas, así como una reducción de 5-HIAA a dosis bajas y un incremento significativo de dichos niveles a dosis altas (Taylor and Fennessy, 1977). Clásicamente, el comportamiento bifásico de los cannabinoides no sólo depende de la dosis, sino también del tipo de ligando y del tipo de célula en la que éste actúa. Hoy en día es necesario añadir otro factor igualmente clave, que de hecho abre la puerta a la

posibilidad de dar respuesta a la compleja farmacología observada a nivel de activación cannabinoide en múltiples procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos: la oligomerización. Sin duda, la interacción de los receptores cannabinoideos entre ellos y con otros GPCRs permite explicar en parte la diversidad de acciones farmacológicas de los cannabinoideos ya que los oligómeros son entidades con características bioquímicas únicas.

Los cannabinoideos se usan en oncología por sus efectos paliativos, principalmente como antieméticos. Sin embargo los cannabinoideos están en el centro de atención en oncología dado su papel en la regulación que ejercen sobre las vías de supervivencia y muerte celular. Hay evidencia múltiple que indica que la capacidad anti-tumoral de los cannabinoideos se basa en una inducción de la muerte celular por apoptosis y en una inhibición de la proliferación celular (Guzmán, 2003; Jones and Howl, 2003; Sarfaraz et al., 2008). Pocos estudios se han realizado *in vivo* por lo que su utilidad práctica en tratamiento anti-oncogénico está en cuestión (McKallip et al., 2005). Los datos experimentales *a priori* contradictorios sobre el papel pro-oncogénico o anti-tumoral de los cannabinoideos se pueden explicar, en parte, por su comportamiento bifásico y la mutua modulación de los receptores que interaccionan entre ellos formando heterómeros de receptores. En este contexto, el trabajo titulado *Targeting CB₂-GPR55 receptor heteromers modulates cancer cell signaling* aquí presentado muestra por primera vez la importancia de la oligomerización de receptores cannabinoideos en el papel bifásico del Δ^9 -THC como supresor o inductor de la proliferación tumoral. Si bien la posible existencia y relevancia funcional de heterómeros implicando al receptor CB₁ ha sido ampliamente estudiada, existen pocas referencias sobre la formación de heterómeros con el receptor CB₂. De hecho, solo se ha descrito la existencia del heterómero de receptores CB₁-CB₂ en células neuronales transfectadas y en glándula pineal, NAc y globo pálido en cerebro de rata (Callén et al., 2012). A pesar de que el papel fisiológico del receptor GPR55 es desconocido, múltiples estudios han demostrado que el receptor está de alguna manera involucrado en el crecimiento y la proliferación tumorales. Teniendo en cuenta la reportada sobre-expresión de los receptores CB₂ y GPR55 en diversos tipos de tumores humanos así como su implicación en el control del destino de las células tumorales (Velasco et al., 2012), se hipotetizó la formación de heterómeros entre ellos y su implicación en la modulación de los efectos descritos para GPR55 en células cancerígenas. Si bien la formación del complejo no se había descrito, Balenga y colaboradores sí reportaron la existencia de un *cross-talk* funcional entre ambos receptores en neutrófilos humanos; demostraron que la modulación a nivel de proteínas G heterotriméricas permite la migración eficiente de los neutrófilos hacia focos de inflamación, mientras que, por activación del receptor GPR55, se previene la lesión excesiva del tejido al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (Balenga et al., 2011). Los resultados aquí obtenidos demuestran la expresión y funcionalidad del heterómero de receptores CB₂-GPR55 tanto *in vitro*, en células HEK-293T, en dos modelos celulares de cáncer de mama (BT474) y en glioblastoma humano (T98G), como *in vivo*, en tumores subcutáneos generados por inyección de células T98G en ratones atímicos. Además, muestran que la interacción del receptor GPR55 con el receptor CB₂ formando heterómeros de receptores constituye una nueva entidad bioquímica cuya modulación puede modificar la actividad anti-tumoral de los cannabinoideos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los resultados de la Tesis también describen el comportamiento bifásico del Δ^9 -THC, que teniendo en cuenta el *cross*-antagonismo bidireccional descrito a nivel de cAMP y fosforilación de ERK1/2, requiere de la presencia del complejo heteromérico. Anavi-Goffer y colaboradores sugirieron el comportamiento del Δ^9 -THC como inhibidor alostérico del receptor GPR55 a nivel de fosforilación de ERK1/2 (Anavi-Goffer et al., 2012); en esta Tesis se muestra al Δ^9 -THC como un antagonista del receptor GPR55 a nivel de vías de señalización celular. Así, a bajas dosis, el Δ^9 -THC se une de manera preferente al

receptor CB₂, actuando como agonista mientras que a elevadas concentraciones es capaz de unirse al receptor GPR55 y bloquear su activación. A elevadas concentraciones, el *cross*-antagonismo inhibe la señalización del receptor CB₂. En un contexto tumoral, la activación del receptor CB₂ por Δ⁹-THC estaría induciendo la activación de vías de señalización pro-oncogénicas mientras que el bloqueo de los receptores GPR55 y el *cross*-antagonismo descrito estarían contribuyendo fuertemente a la respuesta anti-tumoral. Así mismo los resultados permiten entender el aumento del crecimiento tumoral en respuesta a Δ⁹-THC observado en tumores en los que el receptor GPR55 ha sido silenciado, de manera que el efecto observado correspondería a su actividad como agonista de los receptores CB₂.

El sistema endocannabinoide se observa desregulado en gran variedad de cánceres y son múltiples los estudios que evidencian el papel del receptor CB₂ como posible diana en las terapias anti-tumorales. Ahora bien, la información disponible sobre el posible papel de este receptor en la generación tumoral y su progresión es muy escasa. De hecho, el posible papel pro-oncogénico del receptor CB₂ se describió por primera vez en el 2015 (Pérez-Gómez et al., 2015). Este estudio demuestra no solo que el receptor CB₂ ejerce una función pro-oncogénica significativa en cáncer de mama HER2 positivo sino también que juega un papel crucial en la señalización pro-oncogénica mediada por el receptor tirosina-quinasa HER2. La activación del receptor HER2 induce la expresión del receptor CB₂ activando el factor de transcripción ELK1 vía señalización por MAPK; el incremento en la expresión del receptor CB₂ promueve la formación de heterómeros de receptores CB₂-HER2, complejo en el que el receptor CB₂ promueve la señalización pro-oncogénica de HER2 mediante la activación de la tirosina quinasa c-Src, promotora de proliferación celular, supervivencia, migración y angiogénesis, y la desregulación de la cual se asocia con oncogénesis (Pérez-Gómez et al., 2015). Estos resultados sugieren como nueva y razonable estrategia terapéutica el considerar ambos receptores simultáneamente como diana farmacológica, buscando la sinergia de los efectos anti-tumorales. Los resultados presentados en esta Tesis sugieren la actividad pro-oncogénica de los agonistas del receptor CB₂, y pone de manifiesto la importancia de la heteromerización para poder diseñar tratamientos anti-oncogénicos.



5. CONCLUSIONES

En referencia al **objetivo 1:**

- Se ha demostrado la formación de heterodímeros de receptores GHS-R1a-OX₁, LEP-OX₁ y LEP-GHS-R1a, así como la formación de trímeros formados por los tres receptores en células HEK-293T. Se ha obtenido evidencia de la expresión del complejo heterotrimérico en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas de rata. Se han identificado particularidades farmacológicas y funcionales del heterotrimero que demuestran que la primera interrelación ente orexina, grelina y leptina descrita ocurre a nivel de receptores interaccionando en la superficie celular.

En referencia al **objetivo 2:**

- Se ha demostrado la formación de heterodímeros de los receptores OX₁ y CRF₂ en células vivas. El complejo, que se expresa en la VTA de ratas, presenta propiedades farmacológicas y de señalización únicas y la anfetamina afecta su señalización. La anfetamina interacciona con el receptor σ_1 , que a su vez interacciona con el de CRF₂, y con los receptores σ_2 , que a su vez interacciona con el receptor OX₁. El balance σ_1/σ_2 y la expresión de los heterómeros OX₁/CRF₂ en una célula determinada condiciona el efecto de la anfetamina y la señalización inducida por orexina y CRF.

En referencia al **objetivo 3:**

- Se ha identificado una localización preferente del heterómero de receptores A_{2A}-CB₁ en proyecciones GABAérgicas del estriado dorsal. El complejo es funcional tanto en secciones de estriado procedentes de ratones WT como en neuroblastos estriatales que expresan la proteína huntingtina WT (STHdhQ7) o mutada (STHdhQ111). Se ha identificado un acoplamiento preferente a proteína G_q, a diferencia del acoplamiento clásico del receptor A_{2A} a G_{s/olf} y del receptor CB₁ a proteína G_i. La expresión del heterómero de receptores A_{2A}-CB₁ en ratones modelo de la enfermedad de Huntington es notable en estadios tempranos de la enfermedad pero disminuye en estadios avanzados y se pierde en el caudado-putamen de pacientes de avanzada progresión.

En referencia al **objetivo 4:**

- Se ha demostrado la formación de heterodímeros de receptores CB₂-GPR55 en células HEK-293T y en dos líneas de células cancerígenas humanas procedentes de un glioblastoma (T98G) y un adenocarcinoma de mama (BT474). Los complejos CB₂-GPR55 están implicados de manera crítica en la respuesta de las células cancerígenas a Δ^9 -THC tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro* se ha demostrado que el efecto bimodal del Δ^9 -THC requiere de la expresión del heterómero de receptores, de manera que a bajas concentraciones es capaz de activar principalmente el receptor CB₂, mientras a concentraciones elevadas lo bloquea vía *cross*-antagonismo al unirse al receptor GPR55. El efecto bimodal dependiente de la formación del heterómero de receptores se ha demostrado también *in vivo*, en tumores subcutáneos generados por inyección de células T98G en ratones atímicos.



6. ANNEXOS

6.1. Anexo 1

En el transcurso de la elaboración de la presente Tesis doctoral he colaborado en los siguientes artículos publicados:

- Estefanía Moreno, David Moreno-Delgado, Gemma Navarro, Hanne H. Hoffmann, Silvia Fuentes, Santi Rosell-Vilar, Paola Gasperini, Mar Rodríguez-Ruiz, **Mireia Medrano**, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Carmen Lluís, Sergi Ferré, Jordi Ortiz, Enric I. Canela*, Peter McCormick*. ***Cocaine disrupts histamine H_3 receptor modulation of dopamine D_1 receptor signaling: receptors σ_1 - D_1 - H_3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects.***

The Journal of Neuroscience. 2014. 34(10):3545–3558.

- Gemma Navarro*, David Aguinaga*, Edgar Angelats, **Mireia Medrano**, Estefanía Moreno, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Enric I. Canela, Vicent Casadó, Peter McCormick, Carme Lluís, Sergi Ferré. ***A significant role of the truncated ghrelin receptor GHS-R1b in ghrelin-induced signaling in neurons.***

The Journal of Biological Chemistry. 2016. 291: 13048-13062

6.2. Anexo 2

En el transcurso de la elaboración de la presente Tesis doctoral he colaborado en la realización del trabajo experimental que ha dado lugar a los siguientes manuscritos en vías de publicación:

- David Aguinaga, **Mireia Medrano**, Edgar Angelats, Ignacio Vega-Quiroga, Katia Gysling, Enric I. Canela, Rafael Franco*, Gemma Navarro*. ***Cocaine blocks ghrelin effects via interaction with sigma-1 receptors.***

Manuscrito enviado a *Neuropsychopharmacology*.

- David Aguinaga, **Mireia Medrano**, Ignacio Vega-Quiroga, Katia Gysling, Enric I. Canela, Gemma Navarro*, Rafael Franco*. ***Sigma-2 receptors mediate cocaine effects on dopamine $D1$ receptor signaling.***

Manuscrito en preparación para ser enviado a *Molecular Psychiatry*.

The background of the page is a traditional marbled paper pattern. It features a dense network of thin, brownish-gold veins that branch out across a light cream or off-white base. Interspersed among these are several larger, darker, almost black blotches and streaks, creating a complex, organic texture. The overall appearance is that of an antique or vintage book cover or endpaper.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arévalo, C., de Miguel, R., and Hernández-Tristán, R. (2001). Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *70*, 123–131.
- Arzt, E., and Holsboer, F. (2006). CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 531–538.
- Ashton, J.C., and Glass, M. (2007). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* *5*, 73–80.
- Ashton, C.H., Moore, P.B., Gallagher, P., and Young, A.H. (2005). Cannabinoids in bipolar affective disorder: a review and discussion of their therapeutic potential. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *19*, 293–300.
- Aston-Jones, G., Smith, R.J., Sartor, G.C., Moorman, D.E., Massi, L., Tahsili-Fahadan, P., and Richardson, K.A. (2010). Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res.* *1314*, 74–90.
- Ayoub, M.A., and Pflieger, K.D.G. (2010). Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. *Curr. Opin. Pharmacol.* *10*, 44–52.
- Azad, S.C., Monory, K., Marsicano, G., Cravatt, B.F., Lutz, B., Zieglgänsberger, W., and Rammes, G. (2004). Circuitry for associative plasticity in the amygdala involves endocannabinoid signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9953–9961.
- Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Piñeyro, G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11406–11411.
- Bacart, J., Leloire, A., Levoye, A., Froguel, P., Jockers, R., and Couturier, C. (2010). Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface. *FEBS Lett.* *584*, 2213–2217.
- Bacci, A., Huguenard, J.R., and Prince, D.A. (2004). Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature* *431*, 312–316.
- Bahrenberg, G., Behrmann, I., Barthel, A., Hekerman, P., Heinrich, P.C., Joost, H.-G., and Becker, W. (2002). Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 859–872.
- Baimel, C., and Borgland, S.L. (2012). Hypocretin modulation of drug-induced synaptic plasticity. *Prog. Brain Res.* *198*, 123–131.
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J.L., Brown, P., Pertwee, R.G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., et al. (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 300–302.

- Balcita-Pedicino, J.J., and Sesack, S.R. (2007). Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *J. Comp. Neurol.* *503*, 668–684.
- Baldo, B.A., Gual-Bonilla, L., Sijapati, K., Daniel, R.A., Landry, C.F., and Kelley, A.E. (2004). Activation of a subpopulation of orexin/hypocretin-containing hypothalamic neurons by GABAA receptor-mediated inhibition of the nucleus accumbens shell, but not by exposure to a novel environment. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 376–386.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W., and Lee, K.F. (2000). Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat. Genet.* *24*, 410–414.
- Balenga, N.A.B., Aflaki, E., Kargl, J., Platzer, W., Schröder, R., Blättermann, S., Kostenis, E., Brown, A.J., Heinemann, A., and Waldhoer, M. (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res.* *21*, 1452–1469.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., and Chrousos, G.P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* *17*, 245–261.
- Bamford, N.S., Robinson, S., Palmiter, R.D., Joyce, J.A., Moore, C., and Meshul, C.K. (2004). Dopamine modulates release from corticostriatal terminals. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 9541–9552.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* *17*, 305–311.
- Barr, V.A., Malide, D., Zarnowski, M.J., Taylor, S.I., and Cushman, S.W. (1997). Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* *138*, 4463–4472.
- Bates, S.H., and Myers, M.G. (2004). The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *82*, 12–20.
- Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., et al. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* *421*, 856–859.
- Behan, D.P., Grigoriadis, D.E., Lovenberg, T., Chalmers, D., Heinrichs, S., Liaw, C., and De Souza, E.B. (1996). Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol. Psychiatry* *1*, 265–277.
- Bennett, K.A., Langmead, C.J., Wise, A., and Milligan, G. (2009). Growth hormone secretagogues and growth hormone releasing peptides act as orthosteric super-agonists but not allosteric regulators for activation of the G protein Galpha(o1) by the Ghrelin receptor. *Mol. Pharmacol.* *76*, 802–811.
- Berger, C., Schmid, P.C., Schabitz, W.-R., Wolf, M., Schwab, S., and Schmid, H.H.O. (2004). Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J. Neurochem.* *88*, 1159–1167.

- Bernardis, L.L., and Bellinger, L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 189–287.
- Berridge, C.W., and Waterhouse, B.D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 33–84.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393–428.
- Beuckmann, C.T., Sinton, C.M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Sakurai, T., and Yanagisawa, M. (2004). Expression of a poly-glutamine-ataxin-3 transgene in orexin neurons induces narcolepsy-cataplexy in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 4469–4477.
- Biala, G., and Kruk, M. (2007). Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacol. Rep. PR* 59, 636–644.
- Bifulco, M., Laezza, C., Portella, G., Vitale, M., Orlando, P., De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (2001). Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 2745–2747.
- Birder, L.A., Kanai, A.J., de Groat, W.C., Kiss, S., Nealen, M.L., Burke, N.E., Dineley, K.E., Watkins, S., Reynolds, I.J., and Caterina, M.J. (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13396–13401.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., and Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* 134, 845–852.
- Bisogno, T., Martire, A., Petrosino, S., Popoli, P., and Di Marzo, V. (2008). Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 52, 307–313.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1, 619–625.
- Blázquez, C., González-Feria, L., Alvarez, L., Haro, A., Casanova, M.L., and Guzmán, M. (2004). Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res.* 64, 5617–5623.
- Blázquez, C., Chiarlone, A., Sagredo, O., Aguado, T., Pazos, M.R., Resel, E., Palazuelos, J., Julien, B., Salazar, M., Börner, C., et al. (2011). Loss of striatal type 1 cannabinoid receptors is a key pathogenic factor in Huntington's disease. *Brain J. Neurol.* 134, 119–136.
- Blum, D., Galas, M.-C., Pintor, A., Brouillet, E., Ledent, C., Muller, C.E., Bantubungi, K., Galluzzo, M., Gall, D., Cuvelier, L., et al. (2003). A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5361–5369.

7. Bibliografia

- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., and Ryan, I. (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *81*, 3419–3423.
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., and Bevan, M.D. (2000). Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* *196 (Pt 4)*, 527–542.
- Bonci, A., and Malenka, R.C. (1999). Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 3723–3730.
- den Boon, F.S., Chameau, P., Schaafsma-Zhao, Q., van Aken, W., Bari, M., Oddi, S., Kruse, C.G., Maccarrone, M., Wadman, W.J., and Werkman, T.R. (2012). Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3534–3539.
- Borgelt, L.M., Franson, K.L., Nussbaum, A.M., and Wang, G.S. (2013). The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy* *33*, 195–209.
- Borgland, S.L., Taha, S.A., Sarti, F., Fields, H.L., and Bonci, A. (2006). Orexin A in the VTA is critical for the induction of synaptic plasticity and behavioral sensitization to cocaine. *Neuron* *49*, 589–601.
- Bornert, O., Møller, T.C., Boeuf, J., Candusso, M.-P., Wagner, R., Martinez, K.L., and Simonin, F. (2013). Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. *PLoS One* *8*, e56336.
- Borroto-Escuela, D.O., Tarakanov, A.O., and Fuxe, K. (2016). FGFR1-5-HT1A Heteroreceptor Complexes: Implications for Understanding and Treating Major Depression. *Trends Neurosci.* *39*, 5–15.
- Boutrel, B., Kenny, P.J., Specio, S.E., Martin-Fardon, R., Markou, A., Koob, G.F., and de Lecea, L. (2005). Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 19168–19173.
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 274–286.
- Brischoux, F., Chakraborty, S., Brierley, D.I., and Ungless, M.A. (2009). Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4894–4899.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hökfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15043–15048.
- Bulgari, D., Deitcher, D.L., and Levitan, E.S. (2017). Loss of Huntingtin stimulates capture of retrograde dense-core vesicles to increase synaptic neuropeptide stores. *Eur. J. Cell Biol.*
- Bünemann, M., Frank, M., and Lohse, M.J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 16077–16082.

- Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhatsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 2429–2433.
- Butt, C., Alptekin, A., Shippenberg, T., and Oz, M. (2008). Endogenous cannabinoid anandamide inhibits nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes. *J. Neurochem.* *105*, 1235–1243.
- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D.C.G., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Luján, R., and Ciruela, F. (2009). Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J. Neurochem.* *109*, 1497–1507.
- Caffarel, M.M., Sarrió, D., Palacios, J., Guzmán, M., and Sánchez, C. (2006). Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res.* *66*, 6615–6621.
- Caffarel, M.M., Andradas, C., Mira, E., Pérez-Gómez, E., Cerutti, C., Moreno-Bueno, G., Flores, J.M., García-Real, I., Palacios, J., Mañes, S., et al. (2010). Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol. Cancer* *9*, 196.
- Cai, X.J., Evans, M.L., Lister, C.A., Leslie, R.A., Arch, J.R., Wilson, S., and Williams, G. (2001). Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* *50*, 105–112.
- Calebiro, D., Rieken, F., Wagner, J., Sungkaworn, T., Zabel, U., Borzi, A., Cocucci, E., Zürn, A., and Lohse, M.J. (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 743–748.
- Callén, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortés, A., Mallol, J., Casadó, V., Lanciego, J.L., Franco, R., Lluís, C., et al. (2012). Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J. Biol. Chem.* *287*, 20851–20865.
- Caltabiano, G., Gonzalez, A., Cordero, A., Campillo, M., and Pardo, L. (2013). Chapter Five - The Role of Hydrophobic Amino Acids in the Structure and Function of the Rhodopsin Family of G Protein-Coupled Receptors. In *Methods in Enzymology*, P.M. Conn, ed. (Academic Press), pp. 99–115.
- Cammisotto, P.G., Gélinas, Y., Deshaies, Y., and Bukowiecki, L.J. (2005). Regulation of leptin secretion from white adipocytes by insulin, glycolytic substrates, and amino acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *289*, E166–171.
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., and Iovanna, J.L. (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* *66*, 6748–6755.
- Carrasco, G.A., and Van de Kar, L.D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol.* *463*, 235–272.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1

receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *32*, 2249–2259.

Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., Cortés, A., Mallol, J., Fuxe, K., Canela, E.I., et al. (2008). Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* *5*, 727–733.

Carter-Su, C., Schwartz, J., and Smit, L.S. (1996). Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* *58*, 187–207.

Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., and Franco, R. (1991). The binding of [³H]R-PIA to A1 adenosine receptors produces a conversion of the high- to the low-affinity state. *FEBS Lett.* *286*, 221–224.

Casadó, V., Cortés, A., Ciruela, F., Mallol, J., Ferré, S., Lluís, C., Canela, E.I., and Franco, R. (2007). Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol. Ther.* *116*, 343–354.

Casanova, M.L., Blázquez, C., Martínez-Palacio, J., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M.J., Huffman, J.W., Jorcano, J.L., and Guzmán, M. (2003). Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J. Clin. Invest.* *111*, 43–50.

Castañé, A., Valjent, E., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., and Valverde, O. (2002). Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. *Neuropharmacology* *43*, 857–867.

Castillo, P.E., Younts, T.J., Chávez, A.E., and Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* *76*, 70–81.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* *389*, 816–824.

Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* *288*, 306–313.

Cerione, R.A., Codina, J., Benovic, J.L., Lefkowitz, R.J., Birnbaumer, L., and Caron, M.G. (1984). The mammalian beta 2-adrenergic receptor: reconstitution of functional interactions between pure receptor and pure stimulatory nucleotide binding protein of the adenylate cyclase system. *Biochemistry (Mosc.)* *23*, 4519–4525.

Chan, J.L., and Mantzoros, C.S. (2001). Leptin and the hypothalamic-pituitary regulation of the gonadotropin-gonadal axis. *Pituitary* *4*, 87–92.

Charmandari, E., Tsigos, C., and Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* *67*, 259–284.

- Chaudhury, D., Walsh, J.J., Friedman, A.K., Juarez, B., Ku, S.M., Koo, J.W., Ferguson, D., Tsai, H.-C., Pomeranz, L., Christoffel, D.J., et al. (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* *493*, 532–536.
- Chávez, A.E., Chiu, C.Q., and Castillo, P.E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* *13*, 1511–1518.
- Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., et al. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* *98*, 437–451.
- Chen, B.T., Bowers, M.S., Martin, M., Hopf, F.W., Guillory, A.M., Carelli, R.M., Chou, J.K., and Bonci, A. (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* *59*, 288–297.
- Chen, Y., Wei, L.-N., and Müller, J.D. (2003). Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15492–15497.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* *318*, 1258–1265.
- Chiarlone, A., Bellocchio, L., Blázquez, C., Resel, E., Soria-Gómez, E., Cannich, A., Ferrero, J.J., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., et al. (2014). A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 8257–8262.
- Chiodi, V., Uchigashima, M., Beggiato, S., Ferrante, A., Armida, M., Martire, A., Potenza, R.L., Ferraro, L., Tanganelli, S., Watanabe, M., et al. (2012). Unbalance of CB1 receptors expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* *45*, 983–991.
- Choi, D.L., Davis, J.F., Fitzgerald, M.E., and Benoit, S.C. (2010). The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* *167*, 11–20.
- Choi, W.J., Lee, H.W., Kim, H.O., Chinn, M., Gao, Z.-G., Patel, A., Jacobson, K.A., Moon, H.R., Jung, Y.H., and Jeong, L.S. (2009). Design and synthesis of N(6)-substituted-4'-thioadenosine-5'-uronamides as potent and selective human A(3) adenosine receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* *17*, 8003–8011.
- Christensen, R., Kristensen, P.K., Bartels, E.M., Bliddal, H., and Astrup, A. (2007). Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet Lond. Engl.* *370*, 1706–1713.
- Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* *54*, 323–374.
- Chrousos, G.P., and Gold, P.W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* *267*, 1244–1252.

- Chung, K.Y., Rasmussen, S.G.F., Liu, T., Li, S., DeVree, B.T., Chae, P.S., Calinski, D., Kobilka, B.K., Woods, V.L., and Sunahara, R.K. (2011). Conformational changes in the G protein Gs induced by the β_2 adrenergic receptor. *Nature* 477, 611–615.
- Cianchi, F., Papucci, L., Schiavone, N., Lulli, M., Magnelli, L., Vinci, M.C., Messerini, L., Manera, C., Ronconi, E., Romagnani, P., et al. (2008). Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 7691–7700.
- Ciruela, F., Canela, L., Burgueño, J., Soriguera, A., Cabello, N., Canela, E.I., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Woods, A.S., et al. (2005). Heptaspanning membrane receptors and cytoskeletal/scaffolding proteins: focus on adenosine, dopamine, and metabotropic glutamate receptor function. *J. Mol. Neurosci. MN* 26, 277–292.
- Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R.J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S.R., Mallol, J., et al. (2006). Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 2080–2087.
- Ciruela, F., Vilardaga, J.-P., and Fernández-Dueñas, V. (2010). Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol.* 28, 407–415.
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog. Neurobiol.* 66, 61–79.
- Clegg, D.J., Air, E.L., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2002). Eating elicited by orexin-a, but not melanin-concentrating hormone, is opioid mediated. *Endocrinology* 143, 2995–3000.
- Cluderay, J.E., Harrison, D.C., and Hervieu, G.J. (2002). Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul. Pept.* 104, 131–144.
- Cobos, E., Entrena, J., Nieto, F., Cendán, C., and Del Pozo, E. (2008). Pharmacology and Therapeutic Potential of Sigma1 Receptor Ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366.
- Cohen, C., Perrault, G., Voltz, C., Steinberg, R., and Soubrié, P. (2002). SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. *Behav. Pharmacol.* 13, 451–463.
- Coleman, D.L. (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9, 294–298.
- Coleman, D.L., and Hummel, K.P. (1969). Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 217, 1298–1304.
- Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., and Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25 Suppl 5, S63-67.
- Costa, T., and Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7321–7325.

- Coste, S.C., Kesterson, R.A., Heldwein, K.A., Stevens, S.L., Heard, A.D., Hollis, J.H., Murray, S.E., Hill, J.K., Pantely, G.A., Hohimer, A.R., et al. (2000). Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.* *24*, 403–409.
- Cota, D. (2007). CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *23*, 507–517.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., et al. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649–661.
- Cronstein, B.N., and Sitkovsky, M. (2017). Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 41–51.
- Cudaback, E., Marrs, W., Moeller, T., and Stella, N. (2010). The expression level of CB1 and CB2 receptors determines their efficacy at inducing apoptosis in astrocytomas. *PLoS One* *5*, e8702.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* *50*, 1714–1719.
- Cutler, D.J., Morris, R., Sheridhar, V., Wattam, T.A., Holmes, S., Patel, S., Arch, J.R., Wilson, S., Buckingham, R.E., Evans, M.L., et al. (1999). Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* *20*, 1455–1470.
- Dam, J., and Jockers, R. (2013). Hunting for the functions of short leptin receptor isoforms. *Mol. Metab.* *2*, 327–328.
- Damian, M., Mary, S., Maingot, M., M'Kadmi, C., Gagne, D., Leyris, J.-P., Denoyelle, S., Gaibelet, G., Gavara, L., Garcia de Souza Costa, M., et al. (2015). Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 1601–1606.
- Daniels, D.J., Lenard, N.R., Etienne, C.L., Law, P.-Y., Roerig, S.C., and Portoghesi, P.S. (2005). Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 19208–19213.
- Dannon, P.N., Lowengrub, K., Amiaz, R., Grunhaus, L., and Kotler, M. (2004). Comorbid cannabis use and panic disorder: short term and long term follow-up study. *Hum. Psychopharmacol.* *19*, 97–101.
- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., and Nakazato, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides,

interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 748–753.

Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* *141*, 4255–4261.

Dautzenberg, F.M., and Hauger, R.L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* *23*, 71–77.

De Lean, A., Stadel, J.M., and Lefkowitz, R.J. (1980). A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* *255*, 7108–7117.

De Petrocellis, L., Melck, D., Palmisano, A., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., and Di Marzo, V. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8375–8380.

De Vries, T.J., Shaham, Y., Homberg, J.R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., Vanderschuren, L.J., and Schoffelmeer, A.N. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat. Med.* *7*, 1151–1154.

Denovan-Wright, E.M., and Robertson, H.A. (2000). Cannabinoid receptor messenger RNA levels decrease in a subset of neurons of the lateral striatum, cortex and hippocampus of transgenic Huntington's disease mice. *Neuroscience* *98*, 705–713.

Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., and Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* *34*, 605–613.

Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., and Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* *258*, 1946–1949.

Dezaki, K., Kakei, M., and Yada, T. (2007). Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* *56*, 2319–2327.

Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* *7*, 438–455.

Di Marzo, V., and Després, J.-P. (2009). CB1 antagonists for obesity--what lessons have we learned from rimonabant? *Nat. Rev. Endocrinol.* *5*, 633–638.

Di Marzo, V., and Matias, I. (2005). Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat. Neurosci.* *8*, 585–589.

Di Marzo, V., Hill, M.P., Bisogno, T., Crossman, A.R., and Brotchie, J.M. (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 1432–1438.

- Di Marzo, V., Bisogno, T., De Petrocellis, L., Brandi, I., Jefferson, R.G., Winckler, R.L., Davis, J.B., Dasse, O., Mahadevan, A., Razdan, R.K., et al. (2001a). Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor “hybrid” ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 444–451.
- Di Marzo, V., Goparaju, S.K., Wang, L., Liu, J., Bátkai, S., Járαι, Z., Fezza, F., Miura, G.I., Palmiter, R.D., Sugiura, T., et al. (2001b). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* *410*, 822–825.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* *22*, 391–397.
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., et al. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* *321*, 75–79.
- Dohlman, H.G., Bouvier, M., Benovic, J.L., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1987). The multiple membrane spanning topography of the beta 2-adrenergic receptor. Localization of the sites of binding, glycosylation, and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* *262*, 14282–14288.
- Dornonville de la Cour, C., Björkqvist, M., Sandvik, A.K., Bakke, I., Zhao, C.M., Chen, D., and Håkanson, R. (2001). A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul. Pept.* *99*, 141–150.
- Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 79–94.
- Dowie, M.J., Bradshaw, H.B., Howard, M.L., Nicholson, L.F.B., Faull, R.L.M., Hannan, A.J., and Glass, M. (2009). Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington’s disease. *Neuroscience* *163*, 456–465.
- Downes, G.B., and Gautam, N. (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics* *62*, 544–552.
- D’Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y.-T., Braley, G., Gueorguieva, R., and Krystal, J.H. (2004). The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *29*, 1558–1572.
- Dungo, R., and Deeks, E.D. (2013). Istradefylline: first global approval. *Drugs* *73*, 875–882.
- El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J.-L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2012). Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16342–16347.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* *21*, 1375–1385.

- Ellis, J., Pediani, J.D., Canals, M., Milasta, S., and Milligan, G. (2006). Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J. Biol. Chem.* *281*, 38812–38824.
- Elmqvist, J.K., Maratos-Flier, E., Saper, C.B., and Flier, J.S. (1998). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci.* *1*, 445–450.
- Elsohly, M.A., and Slade, D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* *78*, 539–548.
- Eltzschig, H.K., and Eckle, T. (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat. Med.* *17*, 1391–1401.
- Encinar, J.A., Mallo, G.V., Mizyrycki, C., Giono, L., Gonzalez-Ros, J.M., Rico, M., Cánepa, E., Moreno, S., Neira, J.L., and Iovanna, J.L. (2001). Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *276*, 2742–2751.
- Erb, S., and Stewart, J. (1999). A role for the bed nucleus of the stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, RC35.
- España, R.A., Oleson, E.B., Locke, J.L., Brookshire, B.R., Roberts, D.C.S., and Jones, S.R. (2010). The hypocretin-orexin system regulates cocaine self-administration via actions on the mesolimbic dopamine system. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 336–348.
- Estrada-Sánchez, A.M., and Rebec, G.V. (2012). Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: interactions between neurons and astrocytes. *Basal Ganglia* *2*, 57–66.
- Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat. Neurosci.* *8*, 1481–1489.
- Fadel, J., and Deutch, A.Y. (2002). Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* *111*, 379–387.
- Fan, M.M.Y., and Raymond, L.A. (2007). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* *81*, 272–293.
- Fernández-Ruiz, J., Moreno-Martet, M., Rodríguez-Cueto, C., Palomo-Garo, C., Gómez-Cañas, M., Valdeolivas, S., Guaza, C., Romero, J., Guzmán, M., Mechoulam, R., et al. (2011). Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br. J. Pharmacol.* *163*, 1365–1378.
- Ferrante, R.J., Gutekunst, C.A., Persichetti, F., McNeil, S.M., Kowall, N.W., Gusella, J.F., MacDonald, M.E., Beal, M.F., and Hersch, S.M. (1997). Heterogeneous topographic and cellular distribution of huntingtin expression in the normal human neostriatum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 3052–3063.
- Ferré, 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 A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr. Pharm. Des.* *14*, 1468–1474.

- Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S.R., Javitch, J.A., Lohse, M.J., et al. (2009). Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 131–134.
- Ferré, S., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., and Franco, R. (2010). G protein-coupled receptor heteromers as new targets for drug development. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *91*, 41–52.
- Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* *66*, 413–434.
- Filipek, S., Krzysko, K.A., Fotiadis, D., Liang, Y., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2004). A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* *3*, 628–638.
- Fleckenstein, A.E., Volz, T.J., Riddle, E.L., Gibb, J.W., and Hanson, G.R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *47*, 681–698.
- Ford, L.A., Roelofs, A.J., Anavi-Goffer, S., Mowat, L., Simpson, D.G., Irving, A.J., Rogers, M.J., Rajnicek, A.M., and Ross, R.A. (2010). A role for L-alpha-lysophosphatidylinositol and GPR55 in the modulation of migration, orientation and polarization of human breast cancer cells. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 762–771.
- Förster T (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluorescence. *Ann Phys.* *2*, 55–75.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* *421*, 127–128.
- Franco, R., Canals, M., Marcellino, D., Ferré, S., Agnati, L., Mallol, J., Casadó, V., Ciruela, F., Fuxe, K., Lluís, C., et al. (2003). Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 238–243.
- Franco, R., Martínez-Pinilla, E., Lanciego, J.L., and Navarro, G. (2016). Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Front. Pharmacol.* *7*.
- Franklin, A., and Stella, N. (2003). Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur. J. Pharmacol.* *474*, 195–198.
- Franklin, A., Parmentier-Batteur, S., Walter, L., Greenberg, D.A., and Stella, N. (2003). Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 7767–7775.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B.B., and Flier, J.S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* *1*, 1311–1314.

- Fredholm, B.B. (2011). Notes on the history of caffeine use. *Handb. Exp. Pharmacol.* 1–9.
- Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Linden, J., and Müller, C.E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol. Rev.* 63, 1–34.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.
- Frühbeck, G. (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 393, 7–20.
- Fu, Y., and Neugebauer, V. (2008). Differential mechanisms of CRF1 and CRF2 receptor functions in the amygdala in pain-related synaptic facilitation and behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3861–3876.
- Fujita, W., Gomes, I., Dove, L.S., Prohaska, D., McIntyre, G., and Devi, L.A. (2014). Molecular characterization of eluxadoline as a potential ligand targeting mu-delta opioid receptor heteromers. *Biochem. Pharmacol.* 92, 448–456.
- Fusco, F.R., Chen, Q., Lamoreaux, W.J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J.A., Surmeier, D.J., Honig, M.G., Carlock, L.R., and Reiner, A. (1999). Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 1189–1202.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Benfenati, F., Celani, M., Zini, I., Zoli, M., and Mutt, V. (1983). Evidence for the existence of receptor--receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. *J. Neural Transm. Suppl.* 18, 165–179.
- Galés, C., Rebois, R.V., Hogue, M., Trieu, P., Breit, A., Hébert, T.E., and Bouvier, M. (2005). Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 2, 177–184.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., and Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61.
- Gallagher, J.P., Orozco-Cabal, L.F., Liu, J., and Shinnick-Gallagher, P. (2008). Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 215–225.
- Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M.L., Gómez del Pulgar, T., Izquierdo, M., and Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat. Med.* 6, 313–319.
- Gaoni, Y. and Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1646-1647.
- García-Arencibia, M., García, C., Kurz, A., Rodríguez-Navarro, J.A., Gispert-Sánchez, S., Mena, M.A., Auburger, G., de Yébenes, J.G., and Fernández-Ruiz, J. (2009). Cannabinoid

CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. *J. Neural Transm. Suppl.* 269–275.

García-Gutiérrez, M.S., and Manzanares, J. (2011). Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 25, 111–120.

García-Gutiérrez, M.S., García-Bueno, B., Zoppi, S., Leza, J.C., and Manzanares, J. (2012). Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABA(A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 165, 951–964.

Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelières, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., et al. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127–138.

Gavva, N.R., Bannon, A.W., Surapaneni, S., Hovland, D.N., Lehto, S.G., Gore, A., Juan, T., Deng, H., Han, B., Klionsky, L., et al. (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 3366–3374.

Geisler, S., Derst, C., Veh, R.W., and Zahm, D.S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5730–5743.

Genn, R.F., Tucci, S., Marco, E.M., Viveros, M.P., and File, S.E. (2004). Unconditioned and conditioned anxiogenic effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in the social interaction test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 567–573.

Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J.T., Eisch, A.J., Yanagisawa, M., Nestler, E.J., and DiLeone, R.J. (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 3106–3111.

Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., and Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* 279 (Pt 1), 129–134.

Gerdeman, G.L., Ronesi, J., and Lovinger, D.M. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat. Neurosci.* 5, 446–451.

Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., et al. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. *J. Biol. Chem.* 281, 10856–10864.

Ghelardoni, S., Carnicelli, V., Frascarelli, S., Ronca-Testoni, S., and Zucchi, R. (2006). Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J. Endocrinol. Invest.* 29, 115–121.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8606–8611.

- Glass, M., Dragunow, M., and Faull, R.L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience* 97, 505–519.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B., and Korbonsits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2988.
- Goldsmith, Z.G., and Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122–3142.
- Golebiewska, U., Johnston, J.M., Devi, L., Filizola, M., and Scarlata, S. (2011). Differential response to morphine of the oligomeric state of μ -opioid in the presence of δ -opioid receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 2829–2837.
- Gomes, I., Fujita, W., Chandrakala, M.V., and Devi, L.A. (2013a). Disease-specific heteromerization of G-protein-coupled receptors that target drugs of abuse. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 207–265.
- Gomes, I., Gupta, A., and Devi, L.A. (2013b). G-protein-coupled heteromers: regulation in disease. *Methods Enzymol.* 521, 219–238.
- Gomez, O., Arevalo-Martin, A., Garcia-Ovejero, D., Ortega-Gutierrez, S., Cisneros, J.A., Almazan, G., Sánchez-Rodriguez, M.A., Molina-Holgado, F., and Molina-Holgado, E. (2010). The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia* 58, 1913–1927.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., and Guzmán, M. (2002). De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* 363, 183–188.
- Gozzi, A., Turrini, G., Piccoli, L., Massagrande, M., Amantini, D., Antolini, M., Martinelli, P., Cesari, N., Montanari, D., Tessari, M., et al. (2011). Functional magnetic resonance imaging reveals different neural substrates for the effects of orexin-1 and orexin-2 receptor antagonists. *PloS One* 6, e16406.
- Graf, R., Mattera, R., Codina, J., Evans, T., Ho, Y.K., Estes, M.K., and Birnbaumer, L. (1992). Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers. *Eur. J. Biochem.* 210, 609–619.
- Grammatopoulos, D.K., and Chrousos, G.P. (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 13, 436–444.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., and Büldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918–921.
- Griffond, B., Risold, P.Y., Jacquemard, C., Colard, C., and Fellmann, D. (1999). Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci. Lett.* 262, 77–80.

- Guo, J., and Ikeda, S.R. (2004). Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol. Pharmacol.* *65*, 665–674.
- Guo, L., and Zhen, X. (2015). Sigma-2 receptor ligands: neurobiological effects. *Curr. Med. Chem.* *22*, 989–1003.
- Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17495–17500.
- Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* *27*, 2293–2304.
- Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* *110*, 465–502.
- Guzmán, M. (2003a). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 745–755.
- Guzmán, M. (2003b). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 745–755.
- Habib, K.E., Gold, P.W., and Chrousos, G.P. (2001). Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *30*, 695–728; vii–viii.
- Hájos, N., and Freund, T.F. (2002). Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chem. Phys. Lipids* *121*, 73–82.
- Hampson, A.J., Bornheim, L.M., Scanziani, M., Yost, C.S., Gray, A.T., Hansen, B.M., Leonoudakis, D.J., and Bickler, P.E. (1998). Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J. Neurochem.* *70*, 671–676.
- Han, I., You, Y., Kordower, J.H., Brady, S.T., and Morfini, G.A. (2010). Differential vulnerability of neurons in Huntington’s disease: The role of cell type-specific features. *J. Neurochem.* *113*, 1073–1091.
- Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 688–695.
- Hanner, M., Moebius, F.F., Flandorfer, A., Knaus, H.G., Striessnig, J., Kempner, E., and Glossmann, H. (1996). Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8072–8077.
- Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., et al. (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* *335*, 851–855.
- Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., et al. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* *30*, 345–354.

- Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.L., Rao, J.K., and Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* *9*, 235–244.
- Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 425–433.
- Harris, G.C., and Aston-Jones, G. (2006). Arousal and reward: a dichotomy in orexin function. *Trends Neurosci.* *29*, 571–577.
- Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004). Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* *64*, 1943–1950.
- Hayashi, T., and Su, T. (2005). The Sigma Receptor: Evolution of the Concept in Neuropsychopharmacology. *Curr. Neuropharmacol.* *3*, 267–280.
- Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., et al. (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* *88*, 205–215.
- Haynes, A.C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R.E., Wilson, S., Tadayyon, M., and Arch, J.R. (1999). Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* *20*, 1099–1105.
- Haynes, A.C., Jackson, B., Chapman, H., Tadayyon, M., Johns, A., Porter, R.A., and Arch, J.R. (2000). A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul. Pept.* *96*, 45–51.
- Haynes, A.C., Chapman, H., Taylor, C., Moore, G.B.T., Cawthorne, M.A., Tadayyon, M., Clapham, J.C., and Arch, J.R.S. (2002). Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regul. Pept.* *104*, 153–159.
- Hazzalin, C.A., and Mahadevan, L.C. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 30–40.
- He, D., Wang, J., Zhang, C., Shan, B., Deng, X., Li, B., Zhou, Y., Chen, W., Hong, J., Gao, Y., et al. (2015). Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* *14*, 73.
- He, S.-Q., Zhang, Z.-N., Guan, J.-S., Liu, H.-R., Zhao, B., Wang, H.-B., Li, Q., Yang, H., Luo, J., Li, Z.-Y., et al. (2011). Facilitation of μ -opioid receptor activity by preventing δ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron* *69*, 120–131.
- Hebert, T.E., Moffett, S., Morello, J.P., Loisel, T.P., Bichet, D.G., Barret, C., and Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* *271*, 16384–16392.
- Hegyí, Z., Holló, K., Kis, G., Mackie, K., and Antal, M. (2012). Differential distribution of diacylglycerol lipase-alpha and N-acylphosphatidylethanolamine-specific phospholipase d immunoreactivity in the superficial spinal dorsal horn of rats. *Glia* *60*, 1316–1329.

- Hellewell, S.B., and Bowen, W.D. (1990). A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Res.* *527*, 244–253.
- Henckens, M.J.A.G., Deussing, J.M., and Chen, A. (2016). Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat. Rev. Neurosci.* *17*, 636–651.
- Henstridge, C.M., Balenga, N.A.B., Ford, L.A., Ross, R.A., Waldhoer, M., and Irving, A.J. (2009). The GPR55 ligand L-alpha-lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 183–193.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1932–1936.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., and Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *11*, 563–583.
- Hern, J.A., Baig, A.H., Mashanov, G.I., Birdsall, B., Corrie, J.E.T., Lazareno, S., Molloy, J.E., and Birdsall, N.J.M. (2010). Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2693–2698.
- Higgins, M.J., and Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J. Clin. Invest.* *121*, 3797–3803.
- Hill, M.N., and Gorzalka, B.B. (2005). Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* *15*, 593–599.
- Hoffner, G., Kahlem, P., and Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J. Cell Sci.* *115*, 941–948.
- Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M., and Ernst, O.P. (2009). A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 540–552.
- Hofmann, N.A., Yang, J., Trauger, S.A., Nakayama, H., Huang, L., Strunk, D., Moses, M.A., Klagsbrun, M., Bischoff, J., and Graier, W.F. (2015). The GPR 55 agonist, L- α -lysophosphatidylinositol, mediates ovarian carcinoma cell-induced angiogenesis. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 4107–4118.
- Hohmann, A.G., and Suplita, R.L. (2006). Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* *8*, E693-708.
- Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., Fegley, D., Mangieri, R., Krey, J.F., Walker, J.M., Holmes, P.V., Crystal, J.D., et al. (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* *435*, 1108–1112.

- Holst, B., Brandt, E., Bach, A., Heding, A., and Schwartz, T.W. (2005). Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *19*, 2400–2411.
- ter Horst, G.J., Luiten, P.G., and Kuipers, F. (1984). Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguous nuclei in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* *11*, 59–75.
- Horswill, J.G., Bali, U., Shaaban, S., Keily, J.F., Jeevaratnam, P., Babbs, A.J., Reynet, C., and Wong Kai In, P. (2007). PSNCBAM-1, a novel allosteric antagonist at cannabinoid CB1 receptors with hypophagic effects in rats. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 805–814.
- Houseknecht, K.L., and Portocarrero, C.P. (1998). Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest. Anim. Endocrinol.* *15*, 457–475.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberato, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., et al. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* *273*, 974–977.
- Howick, K., Griffin, B.T., Cryan, J.F., and Schellekens, H. (2017). From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., et al. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* *54*, 161–202.
- Hsieh, Y.-S., Yang, S.-F., and Kuo, D.-Y. (2005). Amphetamine, an appetite suppressant, decreases neuropeptide Y immunoreactivity in rat hypothalamic paraventriculum. *Regul. Pept.* *127*, 169–176.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* *9*, 789–798.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2013). Crystal structure of oligomeric β 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 419–425.
- Hummel, K.P., Dickie, M.M., and Coleman, D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* *153*, 1127–1128.
- Huntington, G. (1872). On chorea. *The Medical and Surgical Reporter.* *26*, 317-321.
- Hutcheson, D.M., Quarta, D., Halbout, B., Rigal, A., Valerio, E., and Heidbreder, C. (2011). Orexin-1 receptor antagonist SB-334867 reduces the acquisition and expression of cocaine-conditioned reinforcement and the expression of amphetamine-conditioned reward. *Behav. Pharmacol.* *22*, 173–181.

- Ibrahim, M.M., Porreca, F., Lai, J., Albrecht, P.J., Rice, F.L., Khodorova, A., Davar, G., Makriyannis, A., Vanderah, T.W., Mata, H.P., et al. (2005). CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3093–3098.
- Ida, T., Nakahara, K., Murakami, T., Hanada, R., Nakazato, M., and Murakami, N. (2000). Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *270*, 318–323.
- Ingalls, A.M., Dickie, M.M., and Snell, G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* *41*, 317–318.
- Izzo, A.A., Aviello, G., Petrosino, S., Orlando, P., Marsicano, G., Lutz, B., Borrelli, F., Capasso, R., Nigam, S., Capasso, F., et al. (2008). Increased endocannabinoid levels reduce the development of precancerous lesions in the mouse colon. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *86*, 89–98.
- Jacobson, K.A., and Gao, Z.-G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 247–264.
- James, M.H., Campbell, E.J., and Dayas, C.V. (2017). Role of the Orexin/Hypocretin System in Stress-Related Psychiatric Disorders. *Curr. Top. Behav. Neurosci.*
- Janetopoulos, C., Jin, T., and Devreotes, P. (2001). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. *Science* *291*, 2408–2411.
- Jarrahan, A., Watts, V.J., and Barker, E.L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *308*, 880–886.
- Ji, G., and Neugebauer, V. (2007). Differential effects of CRF1 and CRF2 receptor antagonists on pain-related sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala. *J. Neurophysiol.* *97*, 3893–3904.
- Jin, K., Xie, L., Kim, S.H., Parmentier-Batteur, S., Sun, Y., Mao, X.O., Childs, J., and Greenberg, D.A. (2004). Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol. Pharmacol.* *66*, 204–208.
- Johansson, S.M., Yang, J.-N., Lindgren, E., and Fredholm, B.B. (2007). Eliminating the antilipolytic adenosine A1 receptor does not lead to compensatory changes in the antilipolytic actions of PGE2 and nicotinic acid. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *190*, 87–96.
- Johns, D.G., Behm, D.J., Walker, D.J., Ao, Z., Shapland, E.M., Daniels, D.A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P.C., Green, P., et al. (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 825–831.
- Johnston, C.A., and Siderovski, D.P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights. *Mol. Pharmacol.* *72*, 219–230.
- Jones, S., and Howl, J. (2003). Cannabinoid receptor systems: therapeutic targets for tumour intervention. *Expert Opin. Ther. Targets* *7*, 749–758.

- Jones, S., Kornblum, J.L., and Kauer, J.A. (2000). Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 5575–5580.
- Jordan, B.A., and Devi, L.A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* *399*, 697–700.
- Kalivas, P.W., and Weber, B. (1988). Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *245*, 1095–1102.
- Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimoto-dani, Y., Uchigashima, M., and Watanabe, M. (2009). Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* *89*, 309–380.
- Kargl, J., Brown, A.J., Andersen, L., Dorn, G., Schicho, R., Waldhoer, M., and Heinemann, A. (2013). A selective antagonist reveals a potential role of G protein-coupled receptor 55 in platelet and endothelial cell function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *346*, 54–66.
- Kargl, J., Andersen, L., Hasenöhr, C., Feuersinger, D., Stančić, A., Fauland, A., Magnes, C., El-Heliebi, A., Lax, S., Uranitsch, S., et al. (2016). GPR55 promotes migration and adhesion of colon cancer cells indicating a role in metastasis. *Br. J. Pharmacol.* *173*, 142–154.
- Kasai, R.S., and Kusumi, A. (2014). Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr. Opin. Cell Biol.* *27*, 78–86.
- Kasai, R.S., Suzuki, K.G.N., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J. Cell Biol.* *192*, 463–480.
- Kassubek, J., Juengling, F.D., Kioschies, T., Henkel, K., Karitzky, J., Kramer, B., Ecker, D., Andrich, J., Saft, C., Kraus, P., et al. (2004). Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *75*, 213–220.
- Katona, I., and Freund, T.F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* *35*, 529–558.
- Katona, I., Sperlág, B., Sík, A., Káfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., and Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 4544–4558.
- Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., and Freund, T.F. (2001). Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 9506–9518.
- Kaushal, N., and Matsumoto, R.R. (2011). Role of Sigma Receptors in Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Curr. Neuropharmacol.* *9*, 54–57.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J., and Emson, P.C. (1995). Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci.* *18*, 527–535.

- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., and Glass, M. (2005). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol. Pharmacol.* 67, 1697–1704.
- Keay, K.A., and Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 669–678.
- Keeble, J., Russell, F., Curtis, B., Starr, A., Pinter, E., and Brain, S.D. (2005). Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in the vascular and hyperalgesic components of joint inflammation. *Arthritis Rheum.* 52, 3248–3256.
- Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.-H., Chen, J.D., et al. (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 7466–7476.
- Keller-Wood, M.E., and Dallman, M.F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5, 1–24.
- Kelley, A.E., and Berridge, K.C. (2002). The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 3306–3311.
- Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 62, 265–304.
- Kerner, P., Klöcker, N., and Bähr, M. (1999). Neuronal death after brain injury. Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell Tissue Res.* 298, 383–395.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., and Smith, R.G. (2012). Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73, 317–332.
- Kim, F.J., Kovalyshyn, I., Burgman, M., Neilan, C., Chien, C.-C., and Pasternak, G.W. (2010). σ 1 Receptor Modulation of G-Protein-Coupled Receptor Signaling: Potentiation of Opioid Transduction Independent from Receptor Binding. *Mol. Pharmacol.* 77, 695–703.
- Kim, J., Li, Y., and Watkins, B.A. (2011). Endocannabinoid signaling and energy metabolism: a target for dietary intervention. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 27, 624–632.
- Kimple, A.J., Bosch, D.E., Giguère, P.M., and Siderovski, D.P. (2011). Regulators of G-Protein Signaling and Their G α Substrates: Promises and Challenges in Their Use as Drug Discovery Targets. *Pharmacol. Rev.* 63, 728–749.
- Kirkham, T.C., Williams, C.M., Fezza, F., and Di Marzo, V. (2002). Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br. J. Pharmacol.* 136, 550–557.
- Kishimoto, S., Gokoh, M., Oka, S., Muramatsu, M., Kajiwara, T., Waku, K., and Sugiura, T. (2003). 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 24469–24475.

- Kishimoto, T., Radulovic, J., Radulovic, M., Lin, C.R., Schrick, C., Hooshmand, F., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., and Spiess, J. (2000). Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat. Genet.* *24*, 415–419.
- Klco, J.M., Lassere, T.B., and Baranski, T.J. (2003). C5a receptor oligomerization. I. Disulfide trapping reveals oligomers and potential contact surfaces in a G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 35345–35353.
- Koerner, A., Kratzsch, J., and Kiess, W. (2005). Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *19*, 525–546.
- Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S., and Yada, T. (2003). Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* *52*, 948–956.
- Kohno, D., Suyama, S., and Yada, T. (2008). Leptin transiently antagonizes ghrelin and long-lastingly orexin in regulation of Ca²⁺ signaling in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *World J. Gastroenterol.* *14*, 6347–6354.
- Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K., and Yasukawa, M. (2006). Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *347*, 827–832.
- Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol. Pharmacol.* *63*, 9–18.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* *402*, 656–660.
- Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* *2*, 1–7.
- Könner, A.C., and Brüning, J.C. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* *16*, 144–152.
- Koob, G.F. (2006). The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addict. Abingdon Engl.* *101 Suppl 1*, 23–30.
- Koob, G.F., and Le Moal, M. (2008). Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *363*, 3113–3123.
- Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A.C., Hochbaum, D., Pereda, M.P., Coso, O.A., Stalla, G.K., Holsboer, F., and Arzt, E. (2002). Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 1638–1651.
- Kreitzer, A.C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 127–147.

- Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* *29*, 717–727.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* *393*, 72–76.
- Kukkonen, J.P., and Leonard, C.S. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 314–331.
- Kull, B., Svenningsson, P., and Fredholm, B.B. (2000). Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* *58*, 771–777.
- Kunos, G., Osei-Hyiaman, D., Bátkai, S., Sharkey, K.A., and Makriyannis, A. (2009). Should peripheral CB(1) cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 1–7.
- Kuperman, Y., and Chen, A. (2008). Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol. Metab.* *TEM* *19*, 122–129.
- Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., Nakazato, M., Yamamoto, Y., Shibuya, I., and Yamashita, H. (2000). Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* *11*, 1977–1980.
- Laezza, C., Pisanti, S., Crescenzi, E., and Bifulco, M. (2006). Anandamide inhibits Cdk2 and activates Chk1 leading to cell cycle arrest in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* *580*, 6076–6082.
- Lammers, G.J., Pijl, H., Iestra, J., Langius, J.A., Buunk, G., and Meinders, A.E. (1996). Spontaneous food choice in narcolepsy. *Sleep* *19*, 75–76.
- Landles, C., and Bates, G.P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* *5*, 958–963.
- Lastres-Becker, I., Hansen, H.H., Berrendero, F., De Miguel, R., Pérez-Rosado, A., Manzanares, J., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J. (2002a). Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synap. N. Y. N* *44*, 23–35.
- Lastres-Becker, I., Gómez, M., De Miguel, R., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J. (2002b). Loss of cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease. *Neurotox. Res.* *4*, 601–608.
- Lastres-Becker, I., Berrendero, F., Lucas, J.J., Martín-Aparicio, E., Yamamoto, A., Ramos, J.A., and Fernández-Ruiz, J.J. (2002c). Loss of mRNA levels, binding and activation of GTP-binding proteins for cannabinoid CB1 receptors in the basal ganglia of a transgenic model of Huntington's disease. *Brain Res.* *929*, 236–242.
- Lastres-Becker, I., Bizat, N., Boyer, F., Hantraye, P., Fernández-Ruiz, J., and Brouillet, E. (2004). Potential involvement of cannabinoid receptors in 3-nitropropionic acid toxicity in vivo. *Neuroreport* *15*, 2375–2379.

- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.-Y., Lu, H.-C., Hille, B., and Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2699–2704.
- Lazarus, M., Shen, H.-Y., Cherasse, Y., Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Bass, C.E., Winsky-Sommerer, R., Semba, K., Fredholm, B.B., Boison, D., et al. (2011). Arousal effect of caffeine depends on adenosine A2A receptors in the shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 10067–10075.
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., et al. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 322–327.
- Lee, C., and Chern, Y. (2014). Adenosine receptors and Huntington's disease. *Int. Rev. Neurobiol.* *119*, 195–232.
- Lee, S.P., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2003). Homo- and hetero-oligomerization of G protein-coupled receptors. *Life Sci.* *74*, 173–180.
- Lefkowitz, R.J., and Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* *308*, 512–517.
- Lefkowitz, R.J., Roth, J., Pricer, W., and Pastan, I. (1970a). ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-125I and its relation to adenyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *65*, 745–752.
- Lefkowitz, R.J., Roth, J., and Pastan, I. (1970b). Radioreceptor assay of adrenocorticotrophic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma. *Science* *170*, 633–635.
- Lehmann, C., Kianian, M., Zhou, J., Küster, I., Kuschnereit, R., Whynot, S., Hung, O., Shukla, R., Johnston, B., Cerny, V., et al. (2012). Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* *16*, R47.
- Leonard, C.S., and Kukkonen, J.P. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling: a functional perspective. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 294–313.
- Levada, O.A., and Cherednichenko, N.V. (2015). [BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF): NEUROBIOLOGY AND MARKER VALUE IN NEUROPSYCHIATRY]. *Lik. Sprava* 15–25.
- Leyva-Illades, D., and Demorrow, S. (2013). Orphan G protein receptor GPR55 as an emerging target in cancer therapy and management. *Cancer Manag. Res.* *5*, 147–155.
- Li, J., Hu, Z., and Lecea, L. (2014). The hypocretins/orexins: integrators of multiple physiological functions. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 332–350.
- Li, Z., Ceccarini, G., Eisenstein, M., Tan, K., and Friedman, J.M. (2013). Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Mol. Metab.* *2*, 364–375.

- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., and Engel, A. (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J. Biol. Chem.* *278*, 21655–21662.
- Ligresti, A., Bisogno, T., Matias, I., De Petrocellis, L., Cascio, M.G., Cosenza, V., D'argenio, G., Scaglione, G., Bifulco, M., Sorrentini, I., et al. (2003). Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* *125*, 677–687.
- Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X., and Robeva, A.S. (1999). Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol. Pharmacol.* *56*, 705–713.
- Llano, I., Leresche, N., and Marty, A. (1991). Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* *6*, 565–574.
- Lodge, D.J., and Grace, A.A. (2008). Amphetamine activation of hippocampal drive of mesolimbic dopamine neurons: a mechanism of behavioral sensitization. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 7876–7882.
- Lohoff, F.W. (2010). Overview of the Genetics of Major Depressive Disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* *12*, 539–546.
- Lohse, M.J., Nuber, S., and Hoffmann, C. (2012). Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol. Rev.* *64*, 299–336.
- Lombard, C., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P. (2007). CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *122*, 259–270.
- Lorente, M., Torres, S., Salazar, M., Carracedo, A., Hernández-Tiedra, S., Rodríguez-Fornés, F., García-Taboada, E., Meléndez, B., Mollejo, M., Campos-Martín, Y., et al. (2011). Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death Differ.* *18*, 959–973.
- Lu, S., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Uehara, K., Yamada, S., Goto, N., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K., et al. (2002). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* *321*, 157–160.
- Luttrell, L.M., and Gesty-Palmer, D. (2010). Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *Pharmacol. Rev.* *62*, 305–330.
- Maamra, M., Bidlingmaier, M., Postel-Vinay, M.C., Wu, Z., Strasburger, C.J., and Ross, R.J. (2001). Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology* *142*, 4389–4393.
- Maccarrone, M., Gubellini, P., Bari, M., Picconi, B., Battista, N., Centonze, D., Bernardi, G., Finazzi-Agrò, A., and Calabresi, P. (2003). Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism. *J. Neurochem.* *85*, 1018–1025.

- Mach, R.H., Zeng, C., and Hawkins, W.G. (2013). The Sigma-2 (σ_2) Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer. *J. Med. Chem.* *56*, 7137–7160.
- Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 299–325.
- Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 3103–3107.
- Mahler, S.V., Moorman, D.E., Smith, R.J., James, M.H., and Aston-Jones, G. (2014). Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function. *Nat. Neurosci.* *17*, 1298–1303.
- Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Gangemi, G., Gazerro, P., Laezza, C., and Bifulco, M. (2011). Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert Opin. Ther. Targets* *15*, 297–308.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Granier, S. (2012). Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* *485*, 321–326.
- Mantsch, J.R., Baker, D.A., Funk, D., Lê, A.D., and Shaham, Y. (2016). Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *41*, 335–356.
- Manzoni, O.J., and Bockaert, J. (2001). Cannabinoids inhibit GABAergic synaptic transmission in mice nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* *412*, R3-5.
- Manzoni, O.J., and Williams, J.T. (1999). Presynaptic regulation of glutamate release in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 6629–6636.
- Marcus, J.N., and Elmquist, J.K. (2006). Orexin Projections and Localization of Orexin Receptors. In *The Orexin/Hypocretin System*, S.N. MD, and T.S. MD, eds. (Humana Press), pp. 21–43.
- Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., and Elmquist, J.K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *435*, 6–25.
- Maresz, K., Carrier, E.J., Ponomarev, E.D., Hillard, C.J., and Dittel, B.N. (2005). Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J. Neurochem.* *95*, 437–445.
- Maresz, K., Pryce, G., Ponomarev, E.D., Marsicano, G., Croxford, J.L., Shriver, L.P., Ledent, C., Cheng, X., Carrier, E.J., Mann, M.K., et al. (2007). Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat. Med.* *13*, 492–497.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* *27*, 97–106.

- Marinelli, S., Pacioni, S., Cannich, A., Marsicano, G., and Bacci, A. (2009). Self-modulation of neocortical pyramidal neurons by endocannabinoids. *Nat. Neurosci.* *12*, 1488–1490.
- Marinissen, M.J., and Gutkind, J.S. (2001). G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* *22*, 368–376.
- Markou, A., Weiss, F., Gold, L.H., Caine, S.B., Schulteis, G., and Koob, G.F. (1993). Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl.)* *112*, 163–182.
- Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci.* *20*, 396–399.
- Marsicano, G., and Lutz, B. (1999). Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* *11*, 4213–4225.
- Marsicano, G., Wotjak, C.T., Azad, S.C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M.G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglgänsberger, W., et al. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* *418*, 530–534.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S.C., Cascio, M.G., Gutiérrez, S.O., van der Stelt, M., et al. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* *302*, 84–88.
- Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., and Gilbert, P.E. (1976). The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *197*, 517–532.
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M.P., and Parolaro, D. (2004). Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *308*, 838–845.
- Matarese, G., Moschos, S., and Mantzoros, C.S. (2005). Leptin in immunology. *J. Immunol. Baltim. Md* *174*, 3137–3142.
- Mathis, G. (1995). Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. *Clin. Chem.* *41*, 1391–1397.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., and Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* *346*, 561–564.
- Matsumoto, R.R., Liu, Y., Lerner, M., Howard, E.W., and Brackett, D.J. (2003). Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur. J. Pharmacol.* *469*, 1–12.
- Matsumoto, R.R., Nguyen, L., Kaushal, N., and Robson, M.J. (2014). Sigma (σ) receptors as potential therapeutic targets to mitigate psychostimulant effects. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* *69*, 323–386.
- Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub, M.A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prézeau, L., et al. (2008). Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat. Methods* *5*, 561–567.

- Mazzola, C., Micale, V., and Drago, F. (2003). Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur. J. Pharmacol.* *477*, 219–225.
- McCaw, E.A., Hu, H., Gomez, G.T., Hebb, A.L.O., Kelly, M.E.M., and Denovan-Wright, E.M. (2004). Structure, expression and regulation of the cannabinoid receptor gene (CB1) in Huntington's disease transgenic mice. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4909–4920.
- McCoy, K.L., Matveyeva, M., Carlisle, S.J., and Cabral, G.A. (1999). Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB2 receptor participation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 1620–1625.
- McKallip, R.J., Lombard, C., Fisher, M., Martin, B.R., Ryu, S., Grant, S., Nagarkatti, P.S., and Nagarkatti, M. (2002). Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* *100*, 627–634.
- McKallip, R.J., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P.S. (2005). Delta-9-tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3281–3289.
- McKee, K.K., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Tan, C.P., Phillips, M.S., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., and Howard, A.D. (1997). Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 415–423.
- McPherson, C.S., Featherby, T., Krstew, E., and Lawrence, A.J. (2007). Quantification of phosphorylated cAMP-response element-binding protein expression throughout the brain of amphetamine-sensitized rats: activation of hypothalamic orexin A-containing neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *323*, 805–812.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., and Compton, D.R. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 83–90.
- Mechoulam, R., Fride, E., and Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* *359*, 1–18.
- Mechoulam, R., Panikashvili, D., and Shohami, E. (2002). Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* *8*, 58–61.
- Melancon, B.J., Hopkins, C.R., Wood, M.R., Emmitte, K.A., Niswender, C.M., Christopoulos, A., Conn, P.J., and Lindsley, C.W. (2012). Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. *J. Med. Chem.* *55*, 1445–1464.
- Melck, D., De Petrocellis, L., Orlando, P., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., and Di Marzo, V. (2000). Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* *141*, 118–126.
- Meschler, J.P., and Howlett, A.C. (2001). Signal transduction interactions between CB1 cannabinoid and dopamine receptors in the rat and monkey striatum. *Neuropharmacology* *40*, 918–926.

- Metna-Laurent, M., and Marsicano, G. (2015). Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors. *Glia* 63, 353–364.
- Miczek, K.A., Yap, J.J., and Covington, H.E. (2008). Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol. Ther.* 120, 102–128.
- Milligan, G. (2009). G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br. J. Pharmacol.* 158, 5–14.
- Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 23–29.
- Millns, P.J., Chapman, V., and Kendall, D.A. (2001). Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br. J. Pharmacol.* 132, 969–971.
- Mitchell, P.B., and Morris, M.J. (2007). Depression and anxiety with rimonabant. *Lancet Lond. Engl.* 370, 1671–1672.
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K., and Matsuda, M. (1999). Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G alpha(i). *Nature* 400, 891–894.
- Monory, K., Blaudzun, H., Massa, F., Kaiser, N., Lemberger, T., Schütz, G., Wotjak, C.T., Lutz, B., and Marsicano, G. (2007). Genetic Dissection of Behavioural and Autonomic Effects of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Mice. *PLoS Biol.* 5.
- Monteleone, P., Matias, I., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Maj, M., and Di Marzo, V. (2005). Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30, 1216–1221.
- More, S.V., and Choi, D.-K. (2015). Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection. *Mol. Neurodegener.* 10.
- Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine Disrupts Histamine H3 Receptor Modulation of Dopamine D1 Receptor Signaling: σ 1-D1-H3 Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 3545–3558.
- Moriconi, A., Cerbara, I., Maccarrone, M., and Topai, A. (2010). GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. *Curr. Med. Chem.* 17, 1411–1429.
- Moriguchi, T., Sakurai, T., Nambu, T., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci. Lett.* 264, 101–104.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., and Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26, 235–269.

- Morita, A., Iwasaki, Y., Kobata, K., Iida, T., Higashi, T., Oda, K., Suzuki, A., Narukawa, M., Sasakuma, S., Yokogoshi, H., et al. (2006). Lipophilicity of capsaicinoids and capsinoids influences the multiple activation process of rat TRPV1. *Life Sci.* *79*, 2303–2310.
- Moro, S., Gao, Z.-G., Jacobson, K.A., and Spalluto, G. (2006). Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists. *Med. Res. Rev.* *26*, 131–159.
- Mueller, W.M., Gregoire, F.M., Stanhope, K.L., Mobbs, C.V., Mizuno, T.M., Warden, C.H., Stern, J.S., and Havel, P.J. (1998). Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology* *139*, 551–558.
- Müller, E.E., Locatelli, V., and Cocchi, D. (1999). Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* *79*, 511–607.
- Mullershausen, F., Zecri, F., Cetin, C., Billich, A., Guerini, D., and Seuwen, K. (2009). Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 428–434.
- Munro, S., Thomas, K.L., and Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* *365*, 61–65.
- Munson, A.E., Harris, L.S., Friedman, M.A., Dewey, W.L., and Carchman, R.A. (1975). Antineoplastic activity of cannabinoids. *J. Natl. Cancer Inst.* *55*, 597–602.
- Muntoni, A.L., Pillolla, G., Melis, M., Perra, S., Gessa, G.L., and Pistis, M. (2006). Cannabinoids modulate spontaneous neuronal activity and evoked inhibition of locus coeruleus noradrenergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 2385–2394.
- Münzberg, H., Huo, L., Nilni, E.A., Hollenberg, A.N., and Bjørbaek, C. (2003). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* *144*, 2121–2131.
- Muthian, S., Rademacher, D.J., Roelke, C.T., Gross, G.J., and Hillard, C.J. (2004). Anandamide content is increased and CB1 cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience* *129*, 743–750.
- Nakamura, M., Kanbayashi, T., Sugiura, T., and Inoue, Y. (2011). Relationship between clinical characteristics of narcolepsy and CSF orexin-A levels. *J. Sleep Res.* *20*, 45–49.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* *827*, 243–260.
- Nasser, M.W., Qamri, Z., Deol, Y.S., Smith, D., Shilo, K., Zou, X., and Ganju, R.K. (2011). Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion. *PLoS One* *6*, e23901.
- Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* *34*, 807–814.
- Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, 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.

Navarro, G., Ferré, S., Cordero, A., Moreno, E., Mallol, J., Casadó, V., Cortés, A., Hoffmann, H., Ortiz, J., Canela, E.I., et al. (2010a). Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* 285, 27346–27359.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010b). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18676–18681.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casado, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010c). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U A* 107, 18676–18681.

Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., et al. (2013). Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* 8, e61245.

Navarro, G., Quiroz, C., Moreno-Delgado, D., Sierakowiak, A., McDowell, K., Moreno, E., Rea, W., Cai, N.-S., Aguinaga, D., Howell, L.A., et al. (2015a). Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 6639–6653.

Navarro, G., Quiroz, C., Moreno-Delgado, D., Sierakowiak, A., McDowell, K., Moreno, E., Rea, W., Cai, N.-S., Aguinaga, D., Howell, L.A., et al. (2015b). Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 6639–6653.

Navarro, G., Cordero, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., et al. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* 14.

Navarro, H.A., Howard, J.L., Pollard, G.T., and Carroll, F.I. (2009). Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB) receptor by RTI-371, a selective inhibitor of the dopamine transporter. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1178–1184.

Neitzel, K.L., and Hepler, J.R. (2006). Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling. *Semin. Cell Dev. Biol.* 17, 383–389.

Nelson, A.B., and Kreitzer, A.C. (2014). Reassessing Models of Basal Ganglia Function and Dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 117–135.

Newton, A.C., and Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 155–172.

- Nguyen, E.C., McCracken, K.A., Liu, Y., Pouw, B., and Matsumoto, R.R. (2005). Involvement of sigma (σ) receptors in the acute actions of methamphetamine: receptor binding and behavioral studies. *Neuropharmacology* *49*, 638–645.
- Nicolini, F., and Politis, M. (2014). Neuroimaging in Huntington's disease. *World J. Radiol.* *6*, 301–312.
- Nomura, D.K., Long, J.Z., Niessen, S., Hoover, H.S., Ng, S.-W., and Cravatt, B.F. (2010). Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* *140*, 49–61.
- Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The dynamic process of $\beta(2)$ -adrenergic receptor activation. *Cell* *152*, 532–542.
- O'Shaughnessy, W.B. (1838-1840 and 1842). On the preparations of the Indian hemp, on gunjah. *Transactions of the Medical and Physical Society of Bengal.* 71-102, 421-461.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 17201–17210.
- Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., Mao, K., Lau, A.L., Yeung, S.Y., Humbert, S., et al. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 16889–16894.
- Ohno-Shosaku, T., and Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* *29*, 1–8.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., and Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* *29*, 729–738.
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., and Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 928–934.
- Oka, S., Toshida, T., Maruyama, K., Nakajima, K., Yamashita, A., and Sugiura, T. (2009). 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphoinositol: a possible natural ligand for GPR55. *J. Biochem. (Tokyo)* *145*, 13–20.
- Okahisa, Y., Kodama, M., Takaki, M., Inada, T., Uchimura, N., Yamada, M., Iwata, N., Iyo, M., Sora, I., Ozaki, N., et al. (2011). Association Study of Two Cannabinoid Receptor Genes, CNR1 and CNR2, with Methamphetamine Dependence. *Curr. Neuropharmacol.* *9*, 183–189.
- Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q. Rev. Biophys.* *39*, 117–166.
- Oliveira, J.M.A. (2010). Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *J. Neurochem.* *114*, 1–12.

- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.-P., Patel, S., Meozzi, P.A., Myers, L., Perchuk, A., Mora, Z., Tagliaferro, P.A., Gardner, E., et al. (2008). Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PloS One* *3*, e1640.
- Oropeza, V.C., Page, M.E., and Van Bockstaele, E.J. (2005). Systemic administration of WIN 55,212-2 increases norepinephrine release in the rat frontal cortex. *Brain Res.* *1046*, 45–54.
- Orrú, M., Zanolivi, J.M., Quiroz, C., Nguyen, H.P., Guitart, X., and Ferré, S. (2011). Functional changes in postsynaptic adenosine A(2A) receptors during early stages of a rat model of Huntington disease. *Exp. Neurol.* *232*, 76–80.
- Orru, M., Bakešová, J., Brugarolas, M., Quiroz, C., Beaumont, V., Goldberg, S.R., Lluís, C., Cortés, A., Franco, R., Casadó, V., et al. (2011). Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists. *PloS One* *6*, e16088.
- Overton, P.G., Richards, C.D., Berry, M.S., and Clark, D. (1999). Long-term potentiation at excitatory amino acid synapses on midbrain dopamine neurons. *Neuroreport* *10*, 221–226.
- Oz, M. (2006). Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr. Pharm. Des.* *12*, 227–239.
- Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M.R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., et al. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain J. Neurol.* *132*, 3152–3164.
- Palczewski, K. (2014). Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *55*, 6651–6672.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* *289*, 739–745.
- Palyha, O.C., Feighner, S.D., Tan, C.P., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Gao, Y.D., Schlem, K.D., Yang, L., Morriello, G.J., Nargund, R., et al. (2000). Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R) conserved from Pufferfish to humans. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 160–169.
- Pamplona, F.A., Prediger, R.D.S., Pandolfo, P., and Takahashi, R.N. (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *188*, 641–649.
- Panikashvili, D., Simeonidou, C., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Breuer, A., Mechoulam, R., and Shohami, E. (2001). An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* *413*, 527–531.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* *5*, 731–736.

- Park, S., Jiang, H., Zhang, H., and Smith, R.G. (2012). Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19003–19008.
- Parmentier-Batteur, S., Jin, K., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 9771–9775.
- Parsons, M.P., Vanni, M.P., Woodard, C.L., Kang, R., Murphy, T.H., and Raymond, L.A. (2016). Real-time imaging of glutamate clearance reveals normal striatal uptake in Huntington disease mouse models. *Nat. Commun.* *7*, 11251.
- Patel, S., and Hillard, C.J. (2006). Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *318*, 304–311.
- Patowary, S., Alvarez-Curto, E., Xu, T.-R., Holz, J.D., Oliver, J.A., Milligan, G., and Raicu, V. (2013). The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochem. J.* *452*, 303–312.
- Patterson, M., Murphy, K.G., le Roux, C.W., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 2205–2211.
- Pazos, M.R., Sagredo, O., and Fernández-Ruiz, J. (2008). The endocannabinoid system in Huntington's disease. *Curr. Pharm. Des.* *14*, 2317–2325.
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* *38*, 233–252.
- Peelman, F., Couturier, C., Dam, J., Zabeau, L., Tavernier, J., and Jockers, R. (2006). Techniques: new pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 218–225.
- Pellissier, L.P., Barthet, G., Gaven, F., Cassier, E., Trinquet, E., Pin, J.-P., Marin, P., Dumuis, A., Bockaert, J., Banères, J.-L., et al. (2011). G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. *J. Biol. Chem.* *286*, 9985–9997.
- Pérez-Gómez, E., Andradás, C., Flores, J.M., Quintanilla, M., Paramio, J.M., Guzmán, M., and Sánchez, C. (2013). The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene* *32*, 2534–2542.
- Pérez-Gómez, E., Andradás, C., Blasco-Benito, S., Caffarel, M.M., García-Taboada, E., Villa-Morales, M., Moreno, E., Hamann, S., Martín-Villar, E., Flores, J.M., et al. (2015). Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *107*, djv077.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.* *74*, 129–180.
- Pertwee, R.G. (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr. Med. Chem.* *6*, 635–664.

- Pertwee, R.G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* *63*, 569–611.
- Pertwee, R.G. (2005a). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J.* *7*, E625–654.
- Pertwee, R.G. (2005b). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci.* *76*, 1307–1324.
- Pertwee, R.G. (2007). GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br. J. Pharmacol.* *152*, 984–986.
- Pertwee, R.G. (2009). Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 397–411.
- Pertwee, R.G. (2010). Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr. Med. Chem.* *17*, 1360–1381.
- Petitot, F., Donlan, M., and Michel, A. (2006). GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem. Biol. Drug Des.* *67*, 252–253.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., and Kilduff, T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 9996–10015.
- Pfleger, K.D.G., and Eidne, K.A. (2005). Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. *Biochem. J.* *385*, 625–637.
- Piñeiro, R., Maffucci, T., and Falasca, M. (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* *30*, 142–152.
- Piper, A.S., Yeats, J.C., Bevan, S., and Docherty, R.J. (1999). A study of the voltage dependence of capsaicin-activated membrane currents in rat sensory neurones before and after acute desensitization. *J. Physiol.* *518 (Pt 3)*, 721–733.
- Pisarchik, A., and Slominski, A.T. (2001). Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 2754–2756.
- Pistis, M., Ferraro, L., Pira, L., Flore, G., Tanganelli, S., Gessa, G.L., and Devoto, P. (2002). Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* *948*, 155–158.
- Pistis, M., Perra, S., Pillolla, G., Melis, M., Gessa, G.L., and Muntoni, A.L. (2004). Cannabinoids modulate neuronal firing in the rat basolateral amygdala: evidence for CB1- and non-CB1-mediated actions. *Neuropharmacology* *46*, 115–125.
- Piston, D.W., and Kremers, G.-J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 407–414.
- Pitler, T.A., and Alger, B.E. (1992). Postsynaptic spike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *12*, 4122–4132.

- Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. *Brain J. Neurol.* *131*, 2860–2869.
- Pryce, G., and Baker, D. (2015). Endocannabinoids in Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* *231*, 213–231.
- Putula, J., Pihlajamaa, T., and Kukkonen, J.P. (2014). Calcium affects OX1 orexin (hypocretin) receptor responses by modifying both orexin binding and the signal transduction machinery. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 5816–5828.
- Qamri, Z., Preet, A., Nasser, M.W., Bass, C.E., Leone, G., Barsky, S.H., and Ganju, R.K. (2009). Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 3117–3129.
- Quarta, D., Valerio, E., Hutcheson, D.M., Hedou, G., and Heidbreder, C. (2010). The orexin-1 receptor antagonist SB-334867 reduces amphetamine-evoked dopamine outflow in the shell of the nucleus accumbens and decreases the expression of amphetamine sensitization. *Neurochem. Int.* *56*, 11–15.
- Quiroz, C., Luján, R., Uchigashima, M., Simoes, A.P., Lerner, T.N., Borycz, J., Kachroo, A., Canas, P.M., Orru, M., Schwarzschild, M.A., et al. (2009). Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *ScientificWorldJournal* *9*, 1321–1344.
- Ramírez, B.G., Blázquez, C., Gómez del Pulgar, T., Guzmán, M., and de Ceballos, M.L. (2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1904–1913.
- Ramirez, S.H., Haskó, J., Skuba, A., Fan, S., Dykstra, H., McCormick, R., Reichenbach, N., Krizbai, I., Mahadevan, A., Zhang, M., et al. (2012). Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 4004–4016.
- Rankovic, Z., Brust, T.F., and Bohn, L.M. (2016). Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *26*, 241–250.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 654–659.
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* *450*, 383–387.
- Raymond, L.A. (2017). Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *483*, 1051–1062.
- Reddy, P.S., and Corley, R.B. (1998). Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *20*, 546–554.

- Rediger, A., Piechowski, C.L., Yi, C.-X., Tarnow, P., Strotmann, R., Grütters, A., Krude, H., Schöneberg, T., Tschöp, M.H., Kleinau, G., et al. (2011). Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J. Biol. Chem.* *286*, 39623–39631.
- Reggio, P.H. (2010). Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown. *Curr. Med. Chem.* *17*, 1468–1486.
- Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, A.B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 5733–5737.
- Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *52*, 179–197.
- Ricci, M.R., Fried, S.K., and Mittleman, K.D. (2000). Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism.* *49*, 421–423.
- Rieder, S.A., Chauhan, A., Singh, U., Nagarkatti, M., and Nagarkatti, P. (2010). Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* *215*, 598–605.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., and Caput, D. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.* *350*, 240–244.
- Rios, C., Gomes, I., and Devi, L.A. (2006). μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br. J. Pharmacol.* *148*, 387–395.
- Risbrough, V.B., Hauger, R.L., Roberts, A.L., Vale, W.W., and Geyer, M.A. (2004). Corticotropin-releasing factor receptors CRF1 and CRF2 exert both additive and opposing influences on defensive startle behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 6545–6552.
- Robbe, D., Kopf, M., Remaury, A., Bockaert, J., and Manzoni, O.J. (2002). Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 8384–8388.
- Robinson, T.E., and Berridge, K.C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *18*, 247–291.
- Robinson, L., McKillop-Smith, S., Ross, N.L., Pertwee, R.G., Hampson, R.E., Platt, B., and Riedel, G. (2008). Hippocampal endocannabinoids inhibit spatial learning and limit spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *198*, 551–563.
- Roche, R., Hoareau, L., Bes-Houtmann, S., Gonthier, M.-P., Laborde, C., Baron, J.-F., Haffaf, Y., Cesari, M., and Festy, F. (2006). Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem. Cell Biol.* *126*, 177–187.
- Rog, D.J., Nurmikko, T.J., Friede, T., and Young, C.A. (2005). Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology* *65*, 812–819.

- Rosenberger, P., Schwab, J.M., Mirakaj, V., Masekowsky, E., Mager, A., Morote-Garcia, J.C., Unertl, K., and Eltzhig, H.K. (2009). Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. *Nat. Immunol.* *10*, 195–202.
- Rosenblatt, A. (2007). Neuropsychiatry of Huntington's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* *9*, 191–197.
- Rosenkilde, M.M., Benced-Jensen, T., Frimurer, T.M., and Schwartz, T.W. (2010). The minor binding pocket: a major player in 7TM receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 567–574.
- Ross, R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* *140*, 790–801.
- Ross, R.A. (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 156–163.
- Ross, R.A., Brockie, H.C., Stevenson, L.A., Murphy, V.L., Templeton, F., Makriyannis, A., and Pertwee, R.G. (1999). Agonist-inverse agonist characterization at CB1 and CB2 cannabinoid receptors of L759633, L759656, and AM630. *Br. J. Pharmacol.* *126*, 665–672.
- Roubos, E.W., Dahmen, M., Kozicz, T., and Xu, L. (2012). Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis. *Gen. Comp. Endocrinol.* *177*, 28–36.
- Rozenfeld, R., Gupta, A., Gagnidze, K., Lim, M.P., Gomes, I., Lee-Ramos, D., Nieto, N., and Devi, L.A. (2011). AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* *30*, 2350–2363.
- Russo, E.B., Jiang, H.-E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D.J., Zhao, Y.-X., Bera, S., et al. (2008). Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J. Exp. Bot.* *59*, 4171–4182.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* *152*, 1092–1101.
- Saal, D., Dong, Y., Bonci, A., and Malenka, R.C. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* *37*, 577–582.
- Sagredo, O., Ramos, J.A., Decio, A., Mechoulam, R., and Fernández-Ruiz, J. (2007). Cannabidiol reduced the striatal atrophy caused 3-nitropropionic acid in vivo by mechanisms independent of the activation of cannabinoid, vanilloid TRPV1 and adenosine A2A receptors. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 843–851.
- Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M.R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J.P., Tolón, R.M., Mechoulam, R., Brouillet, E., et al. (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* *57*, 1154–1167.
- Sagredo, O., Pazos, M.R., Valdeolivas, S., and Fernandez-Ruiz, J. (2012). Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Patents CNS Drug Discov.* *7*, 41–48.

- Sakamoto, F., Yamada, S., and Ueta, Y. (2004). Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul. Pept.* *118*, 183–191.
- Sakurai, T. (2006). Orexin System and Feeding Behavior. In *The Orexin/Hypocretin System*, S.N. MD, and T.S. MD, eds. (Humana Press), pp. 99–106.
- Sakurai, T. (2014). The role of orexin in motivated behaviours. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 719–731.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* *92*, 573–585.
- Salahpour, A., Espinoza, S., Masri, B., Lam, V., Barak, L.S., and Gainetdinov, R.R. (2012). BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. *Front. Endocrinol.* *3*.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., et al. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* *119*, 1359–1372.
- Sánchez, C., de Ceballos, M.L., Gomez del Pulgar, T., Rueda, D., Corbacho, C., Velasco, G., Galve-Roperh, I., Huffman, J.W., Ramón y Cajal, S., and Guzmán, M. (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res.* *61*, 5784–5789.
- Sapolsky, R.M. (1996). Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress Amst. Neth.* *1*, 1–19.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* *21*, 55–89.
- Sarfaraz, S., Adhami, V.M., Syed, D.N., Afaq, F., and Mukhtar, H. (2008). Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res.* *68*, 339–342.
- Sari, Y. (2011). Huntington's Disease: From Mutant Huntingtin Protein to Neurotrophic Factor Therapy. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* *7*, 89–100.
- Sarnyai, Z., Shaham, Y., and Heinrichs, S.C. (2001). The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacol. Rev.* *53*, 209–243.
- Sartor, G.C., and Aston-Jones, G.S. (2012). A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 4623–4631.
- Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron* *89*, 910–926.

- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *64*, 193–198.
- Schellekens, H., van Oeffelen, W.E.P.A., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013). Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* *288*, 181–191.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., and Ferré, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* *83*, 277–292.
- Schlyer, S., and Horuk, R. (2006). I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development. *Drug Discov. Today* *11*, 481–493.
- Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., and Neer, E.J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J. Biol. Chem.* *267*, 13807–13810.
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., and Kruse, A.C. (2016). Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature* *532*, 527–530.
- Schröder, M., and Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* *74*, 739–789.
- Schuld, A., Hebebrand, J., Geller, F., and Pollmächer, T. (2000). Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet Lond. Engl.* *355*, 1274–1275.
- Schultz, W. (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* *36*, 241–263.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* *404*, 661–671.
- Scotter, E.L., Abood, M.E., and Glass, M. (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 480–498.
- Sebastião, A.M., and Ribeiro, J.A. (2009). Adenosine receptors and the central nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 471–534.
- Sharir, H., Console-Bram, L., Mundy, C., Popoff, S.N., Kapur, A., and Abood, M.E. (2012). The endocannabinoids anandamide and virodhamine modulate the activity of the candidate cannabinoid receptor GPR55. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *7*, 856–865.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 823–847.
- Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2003). Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* *375*, 503–515.
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., et al. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through

- the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227–232.
- Siehl, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* 158, 41–49.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802–808.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J.J.-M., Matifas, A., and Kieffer, B.L. (2004). Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J. Neurochem.* 89, 766–775.
- Sinha, R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl.)* 158, 343–359.
- Skoglund, G., Nockert, M., and Holst, B. (2013). Viking and early Middle Ages northern Scandinavian textiles proven to be made with hemp. *Sci. Rep.* 3, 2686.
- Smith, R.J., and Aston-Jones, G. (2012). Orexin/hypocretin 1 receptor antagonist reduces heroin self-administration and cue-induced heroin seeking. *Eur. J. Neurosci.* 35, 798–804.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvratt, M.J., Fisher, M.H., Nargund, R.P., and Patchett, A.A. (1997). Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* 18, 621–645.
- Smith, R.J., See, R.E., and Aston-Jones, G. (2009). Orexin/hypocretin signaling at the orexin 1 receptor regulates cue-elicited cocaine-seeking. *Eur. J. Neurosci.* 30, 493–503.
- Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.
- Solas, M., Francis, P.T., Franco, R., and Ramirez, M.J. (2013). CB2 receptor and amyloid pathology in frontal cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 34, 805–808.
- Srivastava, A., Yano, J., Hirozane, Y., Kefala, G., Gruswitz, F., Snell, G., Lane, W., Ivetac, A., Aertgeerts, K., Nguyen, J., et al. (2014). High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature* 513, 124–127.
- Stanley, R.J., and Thomas, G.M.H. (2016). Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. *PLoS ONE* 11.
- Staton, P.C., Hatcher, J.P., Walker, D.J., Morrison, A.D., Shapland, E.M., Hughes, J.P., Chong, E., Mander, P.K., Green, P.J., Billinton, A., et al. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 139, 225–236.
- Stella, N. (2009). Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology* 56 *Suppl 1*, 244–253.

- van der Stelt, M., and Di Marzo, V. (2005). Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* *7*, 37–50.
- van der Stelt, M., Veldhuis, W.B., Maccarrone, M., Bär, P.R., Nicolay, K., Veldink, G.A., Di Marzo, V., and Vliegthart, J.F.G. (2002). Acute neuronal injury, excitotoxicity, and the endocannabinoid system. *Mol. Neurobiol.* *26*, 317–346.
- van der Stelt, M., Fox, S.H., Hill, M., Crossman, A.R., Petrosino, S., Di Marzo, V., and Brotchie, J.M. (2005). A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1140–1142.
- Strakowski, S.M., DelBello, M.P., Fleck, D.E., Adler, C.M., Anthenelli, R.M., Keck, P.E., Arnold, L.M., and Amicone, J. (2007). Effects of co-occurring cannabis use disorders on the course of bipolar disorder after a first hospitalization for mania. *Arch. Gen. Psychiatry* *64*, 57–64.
- Strehlow, A.N.T., Li, J.Z., and Myers, R.M. (2007). Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 391–409.
- Stricker-Krongrad, A., and Beck, B. (2002). Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 129–133.
- Stryer, L. (1978). Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* *47*, 819–846.
- Stuber, G.D., and Wise, R.A. (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat. Neurosci.* *19*, 198–205.
- Su, T.P. (1982). Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *223*, 284–290.
- Su, T.-P., Hayashi, T., Maurice, T., Buch, S., and Ruoho, A.E. (2010). The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* *31*, 557–566.
- Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., and Waku, K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *215*, 89–97.
- Suzuki, R., Shimojima, H., Funahashi, H., Nakajo, S., Yamada, S., Guan, J.-L., Tsurugano, S., Uehara, K., Takeyama, Y., Kikuyama, S., et al. (2002). Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* *324*, 5–8.
- Sylantsev, S., Jensen, T.P., Ross, R.A., and Rusakov, D.A. (2013). Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5193–5198.
- Szabo, B., and Schlicker, E. (2005). Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb. Exp. Pharmacol.* 327–365.

- Taheri, S., Zeitzer, J.M., and Mignot, E. (2002). The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 283–313.
- Takahashi, K., Furukawa, C., Takano, A., Ishikawa, N., Kato, T., Hayama, S., Suzuki, C., Yasui, W., Inai, K., Sone, S., et al. (2006). The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res.* 66, 9408–9419.
- Takeda, S., Yamaori, S., Motoya, E., Matsunaga, T., Kimura, T., Yamamoto, I., and Watanabe, K. (2008). Delta(9)-Tetrahydrocannabinol enhances MCF-7 cell proliferation via cannabinoid receptor-independent signaling. *Toxicology* 245, 141–146.
- Tanda, G., Pontieri, F.E., and Di Chiara, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* 276, 2048–2050.
- Tarditi, A., Camurri, A., Varani, K., Borea, P.A., Woodman, B., Bates, G., Cattaneo, E., and Abbracchio, M.P. (2006). Early and transient alteration of adenosine A2A receptor signaling in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol. Dis.* 23, 44–53.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.
- Taylor, D.A., and Fennessy, M.R. (1977). Biphasic nature of the effects of delta9-tetrahydrocannabinol on body temperature and brain amines of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 46, 93–99.
- Tebano, M.T., Martire, A., and Popoli, P. (2012a). Adenosine A(2A)-cannabinoid CB(1) receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res.* 1476, 108–118.
- Tebano, M.T., Martire, A., and Popoli, P. (2012b). Adenosine A(2A)-cannabinoid CB(1) receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res.* 1476, 108–118.
- Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 5, 30–34.
- The Huntington's disease collaborative Research group (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971–983.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., and Pertwee, R.G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 150, 613–623.
- Thorpe, A.J., and Kotz, C.M. (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Res.* 1050, 156–162.
- Tibiriça, E. (2010). The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2, 5.

- Tóth, A., Blumberg, P.M., and Boczán, J. (2009). Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1). *Vitam. Horm.* *81*, 389–419.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.* *10*, 104–110.
- Tsvetanova, N.G., and von Zastrow, M. (2014). Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 1061–1065.
- Tye, K.M., Mirzabekov, J.J., Warden, M.R., Ferenczi, E.A., Tsai, H.-C., Finkelstein, J., Kim, S.-Y., Adhikari, A., Thompson, K.R., Andalman, A.S., et al. (2013). Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature* *493*, 537–541.
- Tzschentke, T.M. (2001). Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog. Neurobiol.* *63*, 241–320.
- Uchida, S., Soshiroda, K., Okita, E., Kawai-Uchida, M., Mori, A., Jenner, P., and Kanda, T. (2015). The adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline enhances anti-parkinsonian activity induced by combined treatment with low doses of L-DOPA and dopamine agonists in MPTP-treated common marmosets. *Eur. J. Pharmacol.* *766*, 25–30.
- Ulrich-Lai, Y.M., and Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 397–409.
- Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C., and Bonci, A. (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* *411*, 583–587.
- Urigüen, L., Pérez-Rial, S., Ledent, C., Palomo, T., and Manzanares, J. (2004). Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* *46*, 966–973.
- Ursini-Siegel, J., Schade, B., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (2007). Insights from transgenic mouse models of ERBB2-induced breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 389–397.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Stoffel, M., and Friedman, J.M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat. Genet.* *14*, 95–97.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* *213*, 1394–1397.
- Van Laere, K., Casteels, C., Dhollander, I., Goffin, K., Grachev, I., Bormans, G., and Vandenberghe, W. (2010). Widespread decrease of type 1 cannabinoid receptor availability in Huntington disease in vivo. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *51*, 1413–1417.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J.C., Chan, R.K., Li, H.Y., Arias, C., Prins, G.S., Perrin, M., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.* *428*, 191–212.

- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* *310*, 329–332.
- Vara, D., Salazar, M., Olea-Herrero, N., Guzmán, M., Velasco, G., and Díaz-Laviada, I. (2011). Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ.* *18*, 1099–1111.
- Varani, K., Rigamonti, D., Sipione, S., Camurri, A., Borea, P.A., Cattabeni, F., Abbracchio, M.P., and Cattaneo, E. (2001). Aberrant amplification of A(2A) receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1245–1247.
- Varvel, S.A., and Lichtman, A.H. (2002). Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 915–924.
- Varvel, S.A., Anum, E.A., and Lichtman, A.H. (2005). Disruption of CB(1) receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *179*, 863–872.
- Velasco, G., Sánchez, C., and Guzmán, M. (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 436–444.
- Velasco, G., Sánchez, C., and Guzmán, M. (2016). Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Curr. Oncol.* *23*, S23–S32.
- Vezina, P., and Stewart, J. (1990). Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res.* *516*, 99–106.
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., and Lombès, M. (2007). The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* *5*, e012.
- Vilardaga, J.-P., Bünemann, M., Krasel, C., Castro, M., and Lohse, M.J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat. Biotechnol.* *21*, 807–812.
- Villar-Menéndez, I., Blanch, M., Tyebji, S., Pereira-Veiga, T., Albasanz, J.L., Martín, M., Ferrer, I., Pérez-Navarro, E., and Barrachina, M. (2013). Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* *15*, 295–309.
- Viñals, X., Moreno, E., Lanfumey, L., Cordoní, A., Pastor, A., de La Torre, R., Gasperini, P., Navarro, G., Howell, L.A., Pardo, L., et al. (2015). Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors. *PLoS Biol.* *13*, e1002194.
- Violin, J.D., Crombie, A.L., Soergel, D.G., and Lark, M.W. (2014). Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.* *35*, 308–316.

- Vittoz, N.M., Schmeichel, B., and Berridge, C.W. (2008). Hypocretin /orexin preferentially activates caudomedial ventral tegmental area dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 1629–1640.
- Volkow, N.D., and Li, T.-K. (2004). Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 963–970.
- Volkow, N.D., and Wise, R.A. (2005). How can drug addiction help us understand obesity? *Nat. Neurosci.* *8*, 555–560.
- Volmat, V., and Pouyssegur, J. (2001). Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol. Cell* *93*, 71–79.
- Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 559–577.
- Vuillaume, I., Vermersch, P., Destée, A., Petit, H., and Sablonnière, B. (1998). Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *64*, 758–762.
- Wager-Miller, J., Westenbroek, R., and Mackie, K. (2002). Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem. Phys. Lipids* *121*, 83–89.
- Waldeck-Weiermair, M., Zoratti, C., Osibow, K., Balenga, N., Goessnitzer, E., Waldhoer, M., Malli, R., and Graier, W.F. (2008). Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J. Cell Sci.* *121*, 1704–1717.
- Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R.M., Lunzer, M.M., Sharma, S.K., Kostenis, E., Portoghese, P.S., and Whistler, J.L. (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9050–9055.
- Wang, J., and Ueda, N. (2009). Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* *89*, 112–119.
- Wang, L., and Wang, D.H. (2005). TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation* *112*, 3617–3623.
- Wang, B., Shaham, Y., Zitzman, D., Azari, S., Wise, R.A., and You, Z.-B. (2005a). Cocaine experience establishes control of midbrain glutamate and dopamine by corticotropin-releasing factor: a role in stress-induced relapse to drug seeking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5389–5396.
- Wang, B., You, Z.-B., Rice, K.C., and Wise, R.A. (2007). Stress-induced relapse to cocaine seeking: roles for the CRF(2) receptor and CRF-binding protein in the ventral tegmental area of the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* *193*, 283–294.
- Wang, J., Fang, Q., Liu, Z., and Lu, L. (2006). Region-specific effects of brain corticotropin-releasing factor receptor type 1 blockade on footshock-stress- or drug-priming-induced reinstatement of morphine conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *185*, 19–28.

- Wang, L., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A., and Kunos, G. (2003). Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 1393–1398.
- Wang, M.-Y., Orci, L., Ravazzola, M., and Unger, R.H. (2005b). Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18011–18016.
- Wang, Z., Zhou, Y.T., Kakuma, T., Lee, Y., Kalra, S.P., Kalra, P.S., Pan, W., and Unger, R.H. (2000). Leptin resistance of adipocytes in obesity: role of suppressors of cytokine signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *277*, 20–26.
- Ward, R.J., Padiani, J.D., and Milligan, G. (2011). Heteromultimerization of cannabinoid CB(1) receptor and orexin OX(1) receptor generates a unique complex in which both protomers are regulated by orexin A. *J. Biol. Chem.* *286*, 37414–37428.
- Wee, S., and Koob, G.F. (2010). The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl.)* *210*, 121–135.
- Weibrecht, I., Leuchowius, K.-J., Clausson, C.-M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W.M., Kamali-Moghaddam, M., and Söderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev. Proteomics* *7*, 401–409.
- Welch, S.P. (1993). Blockade of cannabinoid-induced antinociception by norbinaltorphimine, but not N,N-diallyl-tyrosine-Aib-phenylalanine-leucine, ICI 174,864 or naloxone in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *265*, 633–640.
- Westphal, N.J., and Seasholtz, A.F. (2006). CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *11*, 1878–1891.
- Whorton, M.R., Bokoch, M.P., Rasmussen, S.G.F., Huang, B., Zare, R.N., Kobilka, B., and Sunahara, R.K. (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7682–7687.
- Whyte, L.S., Ryberg, E., Sims, N.A., Ridge, S.A., Mackie, K., Greasley, P.J., Ross, R.A., and Rogers, M.J. (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16511–16516.
- Williams, C.L., Buchta, W.C., and Riegel, A.C. (2014). CRF-R2 and the heterosynaptic regulation of VTA glutamate during reinstatement of cocaine seeking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 10402–10414.
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., and Yanagisawa, M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 429–458.
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Tokita, S., Williams, S.C., Kisanuki, Y.Y., Marcus, J.N., Lee, C., Elmquist, J.K., Kohlmeier, K.A., et al. (2003). Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* *38*, 715–730.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* *410*, 588–592.

- Winrow, C.J., Tanis, K.Q., Reiss, D.R., Rigby, A.M., Uslaner, J.M., Uebele, V.N., Doran, S.M., Fox, S.V., Garson, S.L., Gotter, A.L., et al. (2010). Orexin receptor antagonism prevents transcriptional and behavioral plasticity resulting from stimulant exposure. *Neuropharmacology* *58*, 185–194.
- Winsky-Sommerer, R., Yamanaka, A., Diano, S., Borok, E., Roberts, A.J., Sakurai, T., Kilduff, T.S., Horvath, T.L., and de Lecea, L. (2004). Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 11439–11448.
- Wise, R.A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 483–494.
- Wolf, M.E. (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog. Neurobiol.* *54*, 679–720.
- Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allosterism: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *12*, 630–644.
- Wreggett, K.A., and Wells, J.W. (1995). Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. *J. Biol. Chem.* *270*, 22488–22499.
- Wright, K., Rooney, N., Feeney, M., Tate, J., Robertson, D., Welham, M., and Ward, S. (2005). Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* *129*, 437–453.
- Wu, Z., and Bowen, W.D. (2008). Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 28198–28215.
- Xi, Z.-X., Peng, X.-Q., Li, X., Song, R., Zhang, H.-Y., Liu, Q.-R., Yang, H.-J., Bi, G.-H., Li, J., and Gardner, E.L. (2011). Brain cannabinoid CB₂ receptors modulate cocaine's actions in mice. *Nat. Neurosci.* *14*, 1160–1166.
- Xiong, W., Hosoi, M., Koo, B.-N., and Zhang, L. (2008). Anandamide inhibition of 5-HT_{3A} receptors varies with receptor density and desensitization. *Mol. Pharmacol.* *73*, 314–322.
- Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J.M., Zhang, F., Tu, Z., Zhou, D., Zeng, D., Vangveravong, S., et al. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat. Commun.* *2*, 380.
- Yamada, H., Okumura, T., Motomura, W., Kobayashi, Y., and Kohgo, Y. (2000). Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *267*, 527–531.
- Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K. ichi, Sugiyama, F., Goto, K., et al. (2003). Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* *38*, 701–713.
- Yan, L., Burbiel, J.C., Maass, A., and Müller, C.E. (2003). Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert Opin. Emerg. Drugs* *8*, 537–576.

- Yang, R., and Barouch, L.A. (2007). Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ. Res.* *101*, 545–559.
- Yang, Z., Aubrey, K.R., Alroy, I., Harvey, R.J., Vandenberg, R.J., and Lynch, J.W. (2008). Subunit-specific modulation of glycine receptors by cannabinoids and N-arachidonyl-glycine. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 1014–1023.
- Ye, F., Than, A., Zhao, Y., Goh, K.H., and Chen, P. (2010). Vesicular storage, vesicle trafficking, and secretion of leptin and resistin: the similarities, differences, and interplays. *J. Endocrinol.* *206*, 27–36.
- Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors Chur Switz.* *24*, 21–44.
- Yoshida, Y., Fujiki, N., Nakajima, T., Ripley, B., Matsumura, H., Yoneda, H., Mignot, E., and Nishino, S. (2001). Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 1075–1081.
- Zeng, C., Vangveravong, S., Xu, J., Chang, K.C., Hotchkiss, R.S., Wheeler, K.T., Shen, D., Zhuang, Z.-P., Kung, H.F., and Mach, R.H. (2007). Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Res.* *67*, 6708–6716.
- Zhang, D., Zhao, Q., and Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells* *38*, 836–842.
- Zhang, F., Chen, Y., Heiman, M., and Dimarchi, R. (2005). Leptin: structure, function and biology. *Vitam. Horm.* *71*, 345–372.
- Zhang, W., Sakurai, T., Fukuda, Y., and Kuwaki, T. (2006a). Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *290*, R1654-1663.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.
- Zhang, Y., Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M.E., Hayden, M.R., and Friedlander, R.M. (2006b). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *EMBO J.* *25*, 5896–5906.
- Zhou, Q.Y., Li, C., Olah, M.E., Johnson, R.A., Stiles, G.L., and Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 7432–7436.
- Zhu, L., Onaka, T., Sakurai, T., and Yada, T. (2002). Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *Neuroreport* *13*, 1351–1353.
- Zimmermann, T. (2005). Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *95*, 245–265.
- Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* *81*, 294–330.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., et al. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493–498.

Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., MacDonald, M., Fossale, E., Zeitlin, S., Buckley, N., et al. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 6972–6983.

Zuccato, C., Marullo, M., Conforti, P., MacDonald, M.E., Tartari, M., and Cattaneo, E. (2008). Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 18, 225–238.

Zvolensky, M.J., Lewinsohn, P., Bernstein, A., Schmidt, N.B., Buckner, J.D., Seeley, J., and Bonn-Miller, M.O. (2008). Prospective Associations between Cannabis Use, Abuse, and Dependence and Panic Attacks and Disorder. *J. Psychiatr. Res.* 42, 1017–1023.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sörgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452–457.