



Heterómeros de receptores de dopamina como dianas terapéuticas en la enfermedad de Parkinson y en discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA

Daniel Farré Pérez

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.

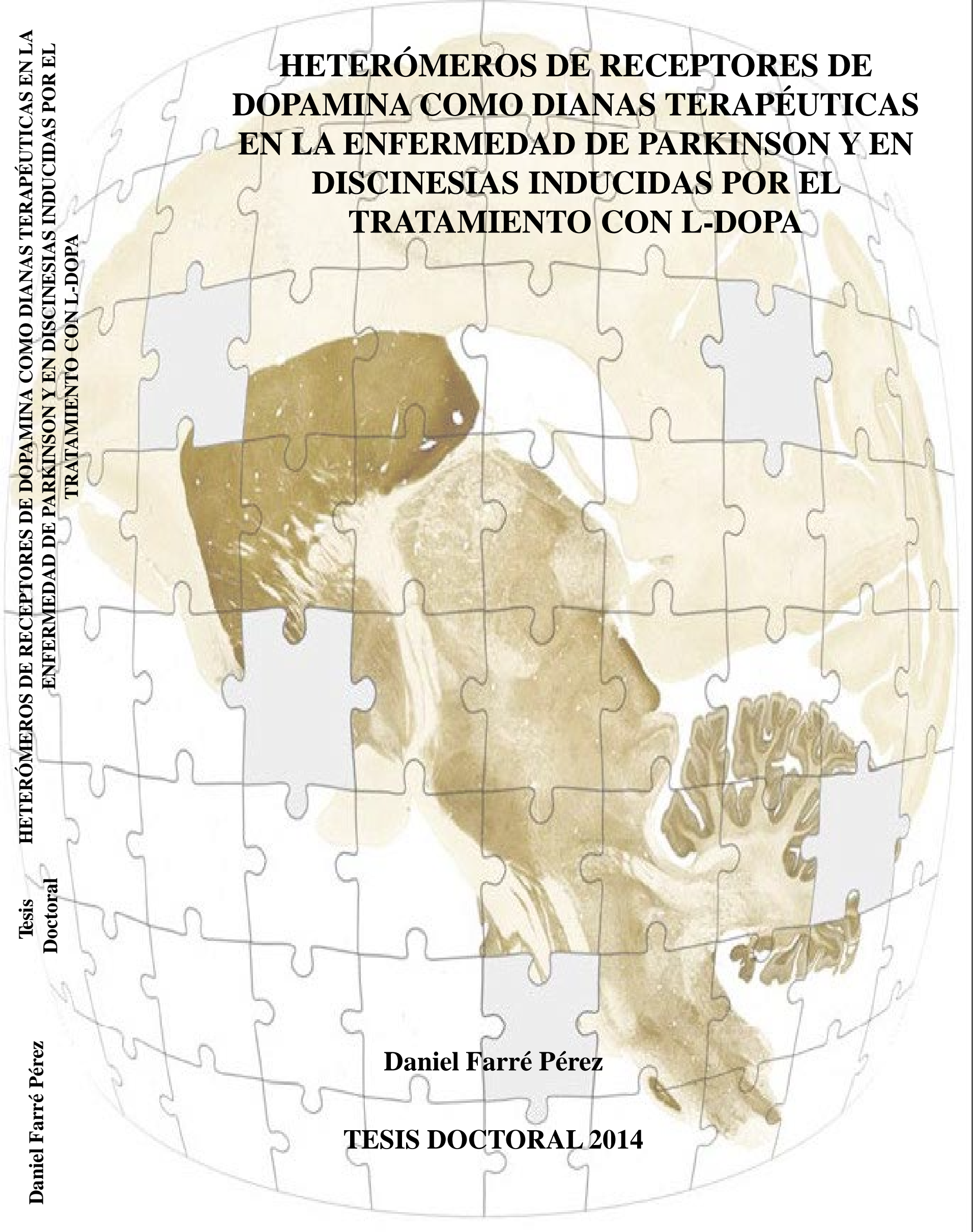
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation 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.

Daniel Farré Pérez
Tesis Doctoral
HETERÓMEROS DE RECEPTORES DE DOPAMINA COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y EN DISCINESIAS INDUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON L-DOPA

HETERÓMEROS DE RECEPTORES DE DOPAMINA COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y EN DISCINESIAS INDUCIDAS POR EL TRATAMIENTO CON L-DOPA

Daniel Farré Pérez

TESIS DOCTORAL 2014



Portada: Modificado de J.-L. Lanciego y A. Vazquez (2012). Montaje gentileza de J.-L. Lanciego. Tinción con técnica de acetilcolinesterasa de un corte parasagital del cerebro del primate *Macaca fascicularis*



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**HETERÓMEROS DE RECEPTORES DE DOPAMINA
COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD
DE PARKINSON Y EN DISCINESIAS INDUCIDAS POR
EL TRATAMIENTO CON L-DOPA**

Memoria presentada por el Licenciado en Biología

DANIEL FARRÉ PÉREZ

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Biomedicina

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología (Universidad de Barcelona) por Daniel Farré Pérez bajo la dirección del Dr. Rafael Franco Fernández y el Dr. Vicent Casadó Burillo

Barcelona, Septiembre de 2014

Dr. Rafael Franco Fernández

Dr. Vicent Casadó Burillo

Daniel Farré Pérez

***A mis padres, Salva y
Manoli, a mi hermana
Ariadna, y a mis abuelas,
Magdalena y Ana***

Con esta Tesis se cierra un capítulo de mi vida que abrí un caluroso día de Junio de 2009 enviando un correo electrónico a Rafa Franco para realizar unas prácticas de verano, y que ha continuado a lo largo de 5 años dando lugar a esta Tesis, en 2014. No sólo agradecer a los que menciono aquí sino a todos los que me han ayudado en algún momento de esta etapa, aún con gestos insignificantes, a hacer más agradable este camino.

Primero de todo agradecer a los jefes de NBM por haberme ayudado aportando cada uno su granito de arena a mi Tesis y facilitarme el día a día en el laboratorio: gracias a **Rafa** por ser el primero en aceptarme en el grupo, por concederme la oportunidad de tener la beca, por permitirme hacer la estancia donde yo quisiera y por apostar tan fuerte con el tema D_1 - D_3 , entre otros; gracias a **Vicent** por su enorme comprensión en todos mis problemas, por estar dispuesto siempre a ayudar y resolver cualquier duda (y siempre con una sonrisa y un *entra al meu despatx* dejando de lado todo), por su gran conocimiento sobre la técnica estrella del *binding* y por muchas otras cosas; a **Antoni** por su gran meticulosidad, por su gran trabajo con el ADA, por sus correcciones tan exhaustivas de mis trabajos que sólo él sabe hacer, por ese "Bon dia" sonriente que siempre dice al entrar por la puerta y por mucho más; a **Vicent** y **Antoni**, agradecerlos conjuntamente por darme la oportunidad de permitir llevar experimentalmente el TFG de Júlia; a **Carne** por su enorme *background* de ciencia que no se le escapa nada y que tanto ha beneficiado al grupo en los proyectos; a **Pepi** por sus ideas en los seminarios de grupo, por convertirnos en científicos eficientes y por mover cielo y tierra para lograr tener los productos necesarios para nuestros experimentos; a **Enric** por saber liderar y unir diplomáticamente este gran proyecto/familia que es NBM y a **Peter** por su contribución al conocimiento de nuevas técnicas. También agradecer a **J.-L. Lanciego** y a su equipo del CIMA de Pamplona por abrirme las puertas de su laboratorio y dejarme trabajar con uno de los modelos más apasionantes del Parkinson. Gracias a **J.-L. Labandeira** y **Ana M. Muñoz**, de la Universidad de Santiago de Compostela, por el enorme trabajo con las ratas.

Gracias a los investigadores post-doctorales: a **Estefanía** o Fifa, por su ayuda incondicional en todos los experimentos siempre con buena cara, por ser una genial compañera de prácticas de Lab II, de laboratorio y de congresos (no de *coffee breaks* por desgracia) y por su gran trabajo con los programas de imagen que ha salvado más de un *paper* y que pocos valoran; también no gracias por hacerme un poco más estéril de lo que soy, al usar ese estufa... A **Gemma** gracias por tu paciencia conmigo, por toda que no es poca de ayuda recibida (tanto verbal como en forma de cDNAs), por incluirme en tu artículo, y por haber levantado mi estado de ánimo cuando estaba bajo con nuestros debates entre casados/solteros, sexo-infidelidad/chicas y muchos otros. Ah y

todo un detalle incluirme en los agradecimientos de tu Tesis aún conociéndonos poco. A **David M.** por su gran rigor científico, por sus propuestas hacia donde llevar los experimentos y por esos seminarios excelentes que hacías y que tanto me ha servido.

Gracias a los compañeros/ doctorandos: a **Jasmina** por la bata prestada el primer día que vine de prácticas al grupo, por el incontable número de ayudas y favores recibidos y que me han salvado la vida en muchas ocasiones, por las vueltas a casa con Renfe debatiendo o rajando, por portarte conmigo tan bien especialmente al principio intentando que me integrara rápidamente con todos e invitándome a muchas cosas cuando no cobraba (por eso sí que te debo mil *eurus*) y por muchas más cosas. A **Lucía** (ya lo dicen, más vale una maña que fuerza) por su gran conocimiento sobre cannabinoides y por resolverme muchas dudas que otros nunca tenían tiempo para resolver. A **Edu** por la inmensa paciencia, por dejarme heredar su gran y genial trabajo sobre el ADA y su poyata, y por haberme irradiado inconscientemente con viales que tenía escondidos bajo la poyata y contribuir junto a Estefanía, a no poder tener retoños en el futuro (aunque sí tuvimos Edu y yo retoños vía telefónica). Al dúo inmunogénico, **Isaac** Newton y **Victor**, por sus *coffee breaks*, por sus grandes momentos de humor (en ocasiones equivalentes a los momentos de humor muy malo y fácil), por el incansable deseo de hablar de *gineceus* y por sus divertidas salidas nocturnas en antros de mala muerte (acéptalo Isaac, jamás iremos a la sala Inferno). A **Marc** ("Stereo love es un temaaaazoo") y **Jana** Bar-kesova (cerveceros desde 2011), porque gracias a que propusieron a Rafa coger a alguien en prácticas, mi Tesis no hubiera sido posible; también gracias a enseñarme todo acerca de los clones y demás técnicas en mis inicios. A **Jana** por tratarme siempre como uno más aunque fuera un ignorante de la ciencia, por el viaje a Praga, por las cervezas tomadas en bares de dudosa reputación y por los consejos; también un no gracias por no entender nunca mis temazos (Barbra streisand inside) y por grabar vídeos en el Lab difundidos sin permiso en las Tesis. A **Jordi B.** por sus consejos en el *binding* y en las disecciones, por ceder su casa en Salou para poder ir al congreso de Purinas 2009 y por las fiestas en The Crows Nest, y por dejarme contribuir a dos artículos muy importantes para esta Tesis. A **Marta** por los buenos momentos en el lab y en el Máster, sobre todo en las clases del curso de experimentación animal, con los crucigramas infinitos. A **Sergio**, mucha suerte en tu nuevo camino científico y felicidades por el gran trabajo en NBM que publicaste junto a otros compañeros. A **Júlia**, por tu esfuerzo y dedicación en el TFG y máster (que no sólo se plasmó en forma de buena nota sino en forma de resultados, con varios pósters y un artículo de momento, *recorda: tot surtirà bé perquè ets la repera*), por aguantarme y mucho cuando te tutelaba y por todos los momentos geniales que hemos pasado juntos. Sabes que me tendrás para lo que necesites.

A **Mireia**, mucho ánimo en tu Tesis y mucha fuerza en tu lucha particular con las becas y el Ministerio. A **David A.**, no haría falta desearte suerte porque lo tienes perfectamente encarrilado, eres un currante y estás muy bien guiado, sacarás una genial Tesis hacia adelante. A **Mar** mucha suerte en tu camino por NBM, lucha por tu Tesis que va por por buen camino y ojalá hagas la estancia donde decidas. A **Quim**, gracias por los *coffee/beer breaks* en Farmacia y suerte en tu etapa UK. A **Edgar**, seguro que pronto consigues la beca que te mereces. Agradecer también a las personas que aunque han pasado fugazmente por el grupo, habéis dejado huella en mí: a **Arce** (mi primer "esclavo"), **Melani** (una pena que no te quedaras en el grupo pero una suerte mantener tu amistad), **Carles** (el Sr. de la informática), **Milena** (seguro echas de menos los Frankfurts Pedralbes) y **Sandra** (muchos éxitos en tu etapa en el IIBB-CSIC). También gracias a tod@s los chicos del CIMA, y especialmente del Lab 2.07 del Dr. Lanciego: a **Salva** (espero que jamás pierdas ese conocimiento sobre la neurología que tienes, sabes perfectamente que llegarás muy lejos tanto como médico como siendo investigador, algo que agradecerá la neurobiología, aparte de ser el chico de los *sin más*), a los post-docs **Iria** (la experta del microscopio electrónico) y **Alberto** (envidio tus conocimientos sobre el modelo animal del macaco y ese trato exquisito y "humano" que les das y espero que cuides bien de Listillo y de mi mono), a **Elvira** (por tus consejos sobre inmunos) y a los dos Diegos, **Diego S.** y **Diego P.**, desde el primer día todos os portasteis genial y me tuvisteis en cuenta en todo, como uno más. A la nueva incorporación del grupo, **Irene**, suerte en tu etapa NBM.

Gracias por el apoyo recibido por parte de mi familia, a quien le dedico esta Tesis, tanto a los que están entre nosotros como a los que por desgracia ya no.

Finalmente y no menos importante, agradecer a los miembros del Tribunal de mi Tesis haber aceptado formar parte del mismo.

Un día mi abuelo me dijo que hay dos tipos de personas: las que trabajan, y las que buscan el mérito. Me dijo que tratara de estar en el primer grupo: hay menos competencia ahí.

Indira Gandhi

ÍNDICE

ÍNDICE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1. | INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 | RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G | 1 |
| 1.1.1. | Estructura de los GPCR | 2 |
| 1.1.2. | Clasificación y nomenclatura de los GPCR | 4 |
| 1.1.3. | Vías de señalización de los GPCR | 6 |
| 1.1.4. | Regulación de la actividad de los GPCR por desensibilización | 10 |
| 1.1.5. | Actividad constitutiva y nomenclatura de los ligandos de los GPCR | 12 |
| 1.1.6. | Los GPCR como dianas terapéuticas | 14 |
| 1.1.7. | Interacciones moleculares de los GPCR con otras proteínas | 15 |
| 1.2 | OLIGOMERIZACIÓN DE LOS GPCR | 18 |
| 1.2.1. | Arquitectura de los dímeros de GPCR | 20 |
| 1.2.2. | Papel funcional de la oligomerización de los GPCR | 21 |
| 1.2.3. | Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR | 22 |
| 1.2.4. | El modelo de receptores diméricos o <i>Two-State Dimer Receptor Model</i> | 30 |
| 1.3 | LA ADENOSINA Y SUS RECEPTORES | 34 |
| 1.3.1. | Funciones en el sistema nervioso central | 34 |
| 1.3.2. | Receptores de adenosina | 36 |
| 1.4 | LA ADENOSINA DESAMINASA (ADA) | 40 |
| 1.4.1. | Características estructurales | 40 |
| 1.4.2. | Mecanismo catalítico | 45 |
| 1.4.3. | Alteraciones en distintas patologías | 46 |
| 1.4.4. | Proteínas de anclaje a la membrana celular (ecto-ADA) | 48 |
| 1.5 | RECEPTORES DE DOPAMINA Y VÍAS DOPAMINÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL | 51 |
| 1.5.1. | La dopamina como neurotransmisor | 51 |
| 1.5.2. | Estructura, clasificación y función de los receptores de dopamina | 53 |
| 1.5.3. | Las vías dopaminérgicas en el SNC | 57 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.5.4. | Los ganglios basales | 60 |
| 1.5.5. | La enfermedad de Parkinson | 64 |
| 1.5.6. | Discinesias inducidas por el tratamiento de L-DOPA | 67 |
| 1.5.7. | Modelos animales para el estudio de la enfermedad de Parkinson | 68 |
| 1.5.7.1. | Lesión dopaminérgica inducida por 6-OHDA | 69 |
| 1.5.7.2. | Lesión dopaminérgica inducida por MPTP | 70 |
| 1.6 | EFFECTOS DE LA COCAÍNA MEDIADOS POR LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D₁ Y D₂ | 72 |
| 1.6.1. | Proteínas de unión de la cocaína | 74 |
| 1.6.2. | Implicación de los receptores de dopamina D ₁ y D ₂ en los efectos de la cocaína | 78 |
| 1.7 | SISTEMA ENDOCANNABINOIDE | 82 |
| 1.7.1 | Receptor de cannabinoides CB ₁ | 84 |
| 2. | OBJETIVOS | 89 |
| 3. | RESULTADOS | 95 |

3.1 La puerta estructural del sitio catalítico de la adenosina desaminasa modula alostéricamente la unión de ligandos a los receptores de adenosina.

97

Eduard Gracia, Daniel Farré, Antoni Cortés, Carles Ferrer-Costa, Modesto Orozco, Josefa Mallol, Carme Lluís, Enric I. Canela, Peter McCormick, Rafael Franco, Francesca Fanelli, Vicent Casadó. **The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors.**

3.2 La cocaína a través de heterómeros de receptores sigma-1 y D₂ de dopamina inhibe la señalización del receptor D₂.

112

Gemma Navarro, Estefanía Moreno, Jordi Bonaventura, Marc Brugarolas, Daniel Farré, David Aguinaga, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Carme Lluís, Sergi Ferré, Rafael Franco, Enric I. Canela, Peter J. McCormick. **Cocaine inhibits dopamine D₂ receptor signaling via sigma-1-D₂ receptor heteromers.**

3.3 El tratamiento de L-DOPA en primates afecta a la expresión de los heterómeros de receptores de adenosina A_{2A} – cannabinoide CB₁ – dopamina D₂ en el núcleo caudado.

129

Jordi Bonaventura, Alberto J. Rico, Estefanía Moreno, Salvador Sierra, Marta Sánchez, Natasha Luquin, Daniel Farré, Christa E. Müller, Eva Martínez-Pinilla, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Marie-Therese Armentero, Annalisa Pinna, Enric I. Canela, Carme Lluís, Peter J. McCormick, José L. Lanciego, Vicent Casadó, Rafael Franco. **L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine–CB₁ cannabinoid–D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus.**

3.4 La L-DOPA afecta al *cross-talk* del heterómero de receptores de adenosina A_{2A} - cannabinoide CB₁ – dopamina D₂ en el estriado de ratas hemiparkinsonianas: estudios bioquímicos y comportamentales.

142

Annalisa Pinna, Jordi Bonaventura, Daniel Farré, Marta Sánchez, Nicola Simola, Josefa Mallol, Carme Lluís, Giulia Costa, Younis Baqi, Christa E. Müller, Antoni Cortés, Peter J. McCormick, Enric I. Canela, Eva Martínez-Pinilla, José L. Lanciego, Vicent Casadó, Marie-Therese Armentero, Rafael Franco. **L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}–cannabinoid CB₁–dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies.**

3.5 Falta de lateralización en la neurotransmisión mediada por el receptor de dopamina D₁ en la disquinesia.

156

Daniel Farré, Ana M. Muñoz, Estefanía Moreno, Irene Reyes-Resina, Júlia Canet-Pons, Iria G. Dopeso-Reyes, Alberto J. Rico, Carme Lluís, Josefa Mallol, Gemma Navarro, Enric I. Canela, Antonio Cortés, José L. Labandeira-García, Vicent Casadó, José L. Lanciego, Rafael Franco. **Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia.**

3.6 Informe de los directores sobre la contribución y el factor de impacto de los artículos presentados en esta Tesis doctoral.

187

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

191

| | | |
|-----------|---------------------|------------|
| 5. | CONCLUSIONES | 209 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA | 217 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| 6-OHDA | 6-hidroxidopamina |
| AC | Adenilato ciclasa |
| ADA | Adenosina desaminasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Ado | Adenosina |
| ADP | Adenosín difosfato |
| AMP | Adenosín monofosfato |
| AMPA | <i>α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide</i> |
| AMPC | Adenosín monofosfato cíclico |
| A_xR | Receptores de adenosina tipo X |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| B_{max} | Unión máxima |
| BRET | <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i> |
| CB_xR | Receptor de cannabinoide tipo X |
| CD26 | Dipeptidil peptidasa IV |
| CL | Cuerpos de Lewy |
| DAA | Deazaadenosina |
| DAG | Diacilglicerol |
| D_c | Índice de cooperatividad |
| DCL | Demencia con cuerpos de Lewy |
| DCF | 8(R)-hidroxi-2'-desoxicoformicina |
| DIL | Discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA |
| DPCPX | Dipropil-ciclopentil-xantina |
| DXR | Receptor de dopamina de tipo X |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| EPN | Núcleo entopeduncular |
| ERK1/2 | <i>Extracelular Signal-Regulated Kinase 1/2</i> |

| | |
|------------------------|--|
| FAD | Flavín adenín dinucleótido |
| FRET | <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GABABR | Receptores de ácido γ -aminobutírico tipo B |
| GB | Ganglios basales |
| GBR1/ GBR2 | Subtipos de los receptores de ácido γ -aminobutírico tipo B |
| GDP | Guanosín difosfato |
| GFP | Green Fluorescence Protein |
| GPCR | Receptores acoplados a proteína G |
| GPe | <i>Globus pallidus</i> externo |
| GPI | <i>Globus pallidus</i> interno |
| GRK | Quinasas de GPCR |
| GTP | Guanosín trifosfato |
| GTPasa | Guanosina trifosfatasa |
| hdppiv | Dipeptidil peptidasa IV humana |
| HDPR | (S)-hidroxi-1,6-dihidropurina ribonucleósido |
| IP₃ | Inositol 1, 4, 5-trifosfato |
| JNK | <i>c-Jun amino-terminal kinase</i> |
| K_D | Constante de afinidad |
| K_{DH} | Constante de disociación de alta afinidad |
| K_{DL} | Constante de disociación de baja afinidad |
| L-DOPA | Levodopa o 1-3,4-dihidroxifenilalanina |
| LTP | Potenciación a largo plazo |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> |
| mGluR | Receptores metabotrópicos de glutamato |
| MPDP | 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridoni |
| MPP⁺ | 1-metil-4-fenilpiridoni |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| MSN | <i>Medium-size spiny neurons</i> |
| NAD⁺ | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> |

| | |
|-------------------------|--|
| NADP⁺ | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphorylated</i> |
| NHERF | Factor regulador del intercambio Na ⁺ /H ⁺ |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| PDZ | <i>Postsynaptic-density-95/discs-large/ZO1</i> |
| PKA | Proteína quinasa A |
| PKC | Proteína quinasa c |
| PLA | <i>Proximity Ligation Assay</i> |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PR | Ribósido de purina |
| R | Receptor inactivo |
| R* | Receptor activo (con actividad constitutiva) |
| RAMPs | <i>Receptor Activity Modifying Proteins</i> |
| RET | <i>Resonance Energy Transfer</i> |
| Rluc | <i>Renilla luciferasa</i> |
| R-PIA | R-phenol-isopropil-adenosina |
| SAH | S-adenosilhomocisteína |
| SAHH | S-adenosilhomocisteína hidrolasa |
| SCID | Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada |
| SH2/SH3 | <i>Src-Homology 2/3</i> |
| SN | Sustancia negra |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNc | Porción compacta de la sustancia negra |
| SNr | Porción reticulada de la sustancia negra |
| SSTR | Receptor de somatostatina |
| THC | Tetrahidrocannabinol |
| TIM | Triosa fosfato isomerasa (TPI) |
| TM o TMD | Dominios transmembrana |
| WT | <i>Wild type</i> |
| YFP | <i>Yellow Fluorescence Protein</i> |

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G

La comunicación celular es un requisito necesario para el mantenimiento y regulación de la homeostasis de los seres vivos. Para ello, las células del organismo tienen la capacidad de reconocer moléculas liberadas al medio extracelular, con la finalidad de procesar gran cantidad de información procedente de otras células. Debido a que muchas de estas moléculas liberadas no entran dentro de la célula a causa de su naturaleza polar, es necesaria la presencia de receptores en la membrana citoplasmática con los que interactuar para ejercer su función. Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) o también llamados receptores de siete dominios de transmembrana (7TMD) constituyen una importante familia de receptores de la membrana celular (Gudermann *et al.* 1997; Marinissen y Gutkind 2001). Estos receptores están codificados por una gran familia de genes; en el caso del genoma humano, más del 1% codifica para más de 1000 proteínas con esta estructura, de las que más del 90% se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (George *et al.* 2002).

Los GPCRs son activados por una gran variedad de ligandos tanto endógenos como exógenos, entre los que se incluyen hormonas, péptidos, aminoácidos, iones y fotones de luz; y transducen la señal a través de un gran número de efectores como la adenilato ciclasa (AC), las fosfolipasas o los canales iónicos, entre otros. Muchas de estas vías de señalización, aunque no todas, están mediadas por el acoplamiento del receptor a una proteína G y, en su conjunto, desempeñan un papel clave en la fisiología celular controlando procesos del organismo como la secreción, la diferenciación o la neurotransmisión, entre otros. Más del 50% de los agentes terapéuticos actualmente comercializados actúan sobre estas proteínas activando (agonistas) o antagonizando (antagonistas) estos receptores (Flower 1999; Marinissen y Gutkind 2001). En la actualidad los GPCRs son considerados como dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos en amplios campos de la medicina (Figura 1).

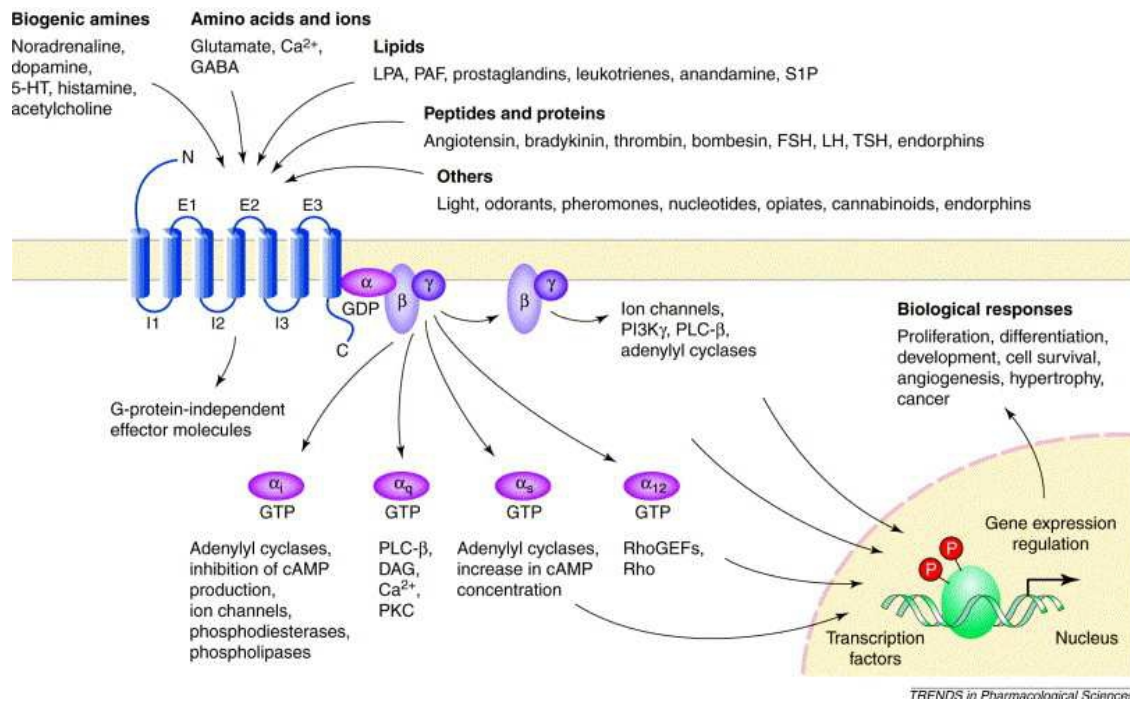


Figura 1. Ligando endógeno y mecanismos de señalización celular responsables de las diversas funciones biológicas de los receptores acoplados a proteína G (extraído de Marinissen y Gutkind 2001)

1.1.1 Estructura de los GPCR

Para que una proteína sea clasificada como receptor de siete dominios transmembrana debe cumplir dos requisitos. El primero consiste en estar constituido por una sola cadena proteica capaz de cruzar siete veces la membrana plasmática. Para ello, debe presentar una estructura con siete secuencias de unos 25-35 residuos aminoacídicos, con alto grado de hidrofobicidad, dispuestos en una estructura de hélices α que atraviesan la membrana celular. Estas hélices están conectadas por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares, quedando el dominio amino terminal orientado hacia el medio extracelular y el carboxilo terminal hacia el intracelular. El segundo requisito es que este receptor tenga la capacidad de interactuar con una proteína G.

Los receptores acoplados a proteína G están parcialmente inmersos en la bicapa lipídica, en un ambiente no polar, formando una estructura compacta de hélices transmembrana. La correcta orientación e integración de la cadena polipeptídica es guiada por un complejo aparato de translocación que reside en el retículo

endoplasmático (RE). Se pueden distinguir dos estados de plegamiento diferentes que se producen tras la translocación inicial del receptor a través del extremo N-terminal dentro del lumen del RE. En el primer plegamiento las hélices α se disponen a través de la bicapa lipídica y el plegamiento de la proteína está dirigido principalmente por los efectos hidrofóbicos. Para minimizar la superficie polar expuesta al ambiente lipídico, los dominios transmembrana adoptan una estructura secundaria dejando los aminoácidos hidrofóbicos enfrentados a la bicapa lipídica y los aminoácidos más hidrofílicos orientados hacia la hendidura generada por el empaquetamiento de los dominios transmembrana. Finalmente, en el segundo plegamiento se forma una estructura terciaria por interacciones específicas hélice-hélice que permite un fuerte empaquetamiento con estructura tipo anillo de los dominios transmembrana (Scarselli *et al.* 2000).

La región N-terminal puede estar glicosilada y la región C-terminal está expuesta a la interacción con otras moléculas de señalización, como quinasas y proteínas β -arrestinas, responsables de procesos de sensibilización, desensibilización e internalización (Lefkowitz 1998; Pflieger *et al.* 2007; DeFea 2011; Schulte *et al.* 2010;). Además, la región carboxi terminal y los bucles intracelulares dos y tres son críticos para la transducción de la señal hacia el interior de la célula ya que son los dominios de unión a la proteína G responsable, en la mayoría de los casos, de iniciar la señalización intracelular (Figura 2).

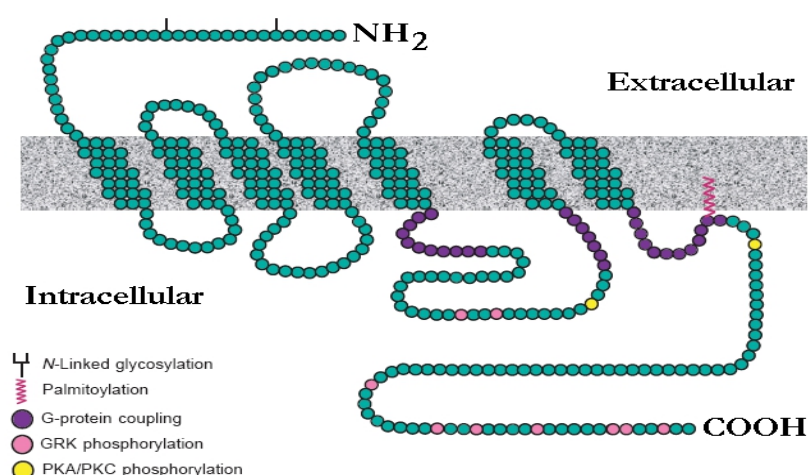


Figura 2. Esquema de la estructura típica de un GPCR (extraído de Lefkowitz 2000)

1.1.2 Clasificación y nomenclatura de los GPCR

Los GPCR se han clasificado según diferentes sistemas. Uno de los más clásicos es el sistema Kolakowski (Kolakowski Jr. 1994), en el que los GPCR se clasifican en 6 familias (A-F) según su estructura y características genéticas. En la Figura 3 se ilustran las tres familias mayoritarias.

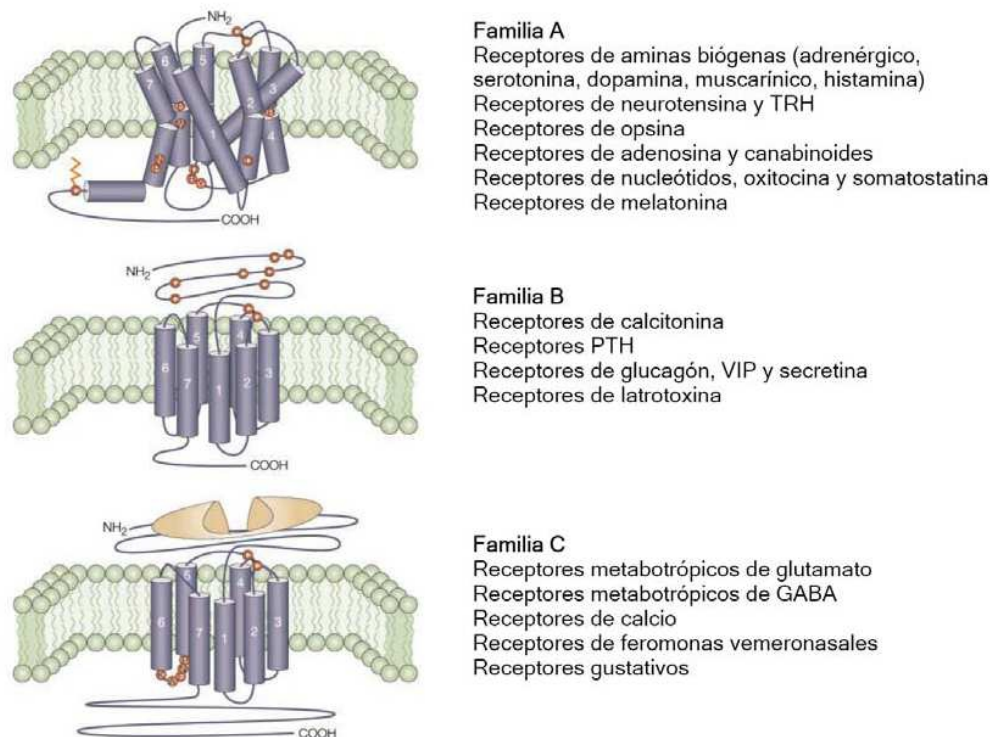


Figura 3. Representación esquemática de las tres principales familias de receptores acoplados a proteína G. Los residuos altamente conservados se indican en círculos rojos (extraído de George *et al.* 2002)

La familia A, también llamada *rodopsin-like* contiene el 90% de todos los GPCR, siendo la más grande y estudiada, e incluye a receptores para una gran variedad de hormonas y neurotransmisores. La homología global entre este tipo de receptores es baja y limitada a un número de residuos altamente conservados. Los receptores se caracterizan por tener un residuo conservado en toda la familia que corresponde al ácido aspártico 130 del motivo Asp-Arg-Tyr (DRY), del tercer segmento transmembrana, como inicialmente se descubrió en el receptor humano β -adrenérgico (Fraser *et al.* 1988), y por tener un puente disulfuro que conecta el primer y el segundo bucle extracelular. Además, muchos receptores tienen una cisteína palmitoilada en la cola C-terminal que sirve de anclaje a la membrana plasmática (Figura 3 línea zigzag naranja).

El estudio de la estructura cristalográfica de la rodopsina indica que los dominios transmembrana están inclinados y enroscados debido al aminoácido prolina que distorsiona los dominios helicoidales transmembrana. En esta familia, el ligando se une en una cavidad formada por los dominios transmembrana, aunque para alguna subfamilia de receptores activados por pequeños péptidos, el reconocimiento se produce a nivel de los bucles extracelulares y del dominio N-terminal (George *et al.* 2002; Jacoby *et al.* 2006).

La familia B incluye aproximadamente 50 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la calcitonina, la hormona paratiroidea (PTH) y el glucagón. La principal característica de esta familia es que posee un extremo amino terminal relativamente largo (aproximadamente 100 residuos), que contiene diversas cisteínas que forman una red de puentes disulfuro (Ulrich *et al.* 1998). Así, los ligando pepticos son reconocidos por el extenso dominio amino terminal de estos receptores (George *et al.* 2002; Jacoby *et al.* 2006). Son de morfología similar a la familia A, pero no parecen palmitoilarse y los residuos y motivos conservados son diferentes. Excepto por el puente disulfuro que conecta el primer y segundo bucle extracelular, esta familia no tiene ningún elemento en común con la familia A y el motivo DRY no existe. Se sabe poco de la orientación de los dominios transmembrana, pero teniendo en cuenta la divergencia de las secuencias aminoacídicas, probablemente son diferentes de los de la familia A.

La familia 3 o C se caracterizan por tener un largo extremo carboxi y amino terminal (500-600 aminoácidos). A esta familia pertenece el receptor metabotrópico de glutamato y el receptor GABA (ácido γ -aminobutírico). La estructura del lugar de unión (representado en la figura 3 en rosado) se ha deducido mediante estudios de cristalografía del extremo N-terminal del receptor metabotrópico de glutamato solubilizado y unido a glutamato (He *et al.* 2002). Se ha visto que forma un dímero unido por puente disulfuro que puede abrirse y cerrarse en el proceso de unión del ligando (He *et al.* 2002). Esta familia no tiene ningún rasgo común con la familia 1 y 2 excepto por la presencia de cisteínas en el bucle extracelular que forman puentes disulfuro. Una característica única de estos receptores es que el tercer bucle intracelular es corto y altamente conservado, y al igual que en la familia 2 tampoco se conoce la

orientación de los dominios de transmembrana (TM) (George *et al.* 2002; Jacoby *et al.* 2006).

Aunque la clasificación A-F está ampliamente aceptada, Fredriksson y colaboradores (Fredriksson *et al.* 2003) efectuaron el primer estudio filogenético de toda la superfamilia de GPCR en el genoma de mamífero, proponiendo una clasificación más detallada. El análisis muestra que hay 5 familias principales para los GPCR humanos: *Glutamate*, *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Frizzled/Tasted2* y *Secretin* (la clasificación GRAFS está basada en sus iniciales) y que dentro de cada familia los receptores comparten un origen evolutivo común. Tres de estas familias, *Rhodopsin* (A), *Secretin* (B) y *Glutamate* (C) se corresponden con la clasificación A-F, mientras que las otras dos familias, *Adhesion* y *Frizzled*, no están incluidas. En esta clasificación la superfamilia de la rodopsina sigue siendo la mayor, y se ha dividido en 4 grupos principales con 13 ramas distintas. Los autores de este nuevo sistema de clasificación defienden la teoría de que los receptores acoplados a proteína G surgieron a partir de un único predecesor común, que a través de duplicaciones génicas, fue evolucionando desde la mayor simplicidad en cuanto a sus orígenes a la enorme complejidad que muestra la superfamilia de estos receptores en la actualidad. La gran diversidad que alcanza esta superfamilia de proteínas de membrana da a entender el importante papel que juegan en la fisiología de cualquier organismo.

1.1.3 Vías de señalización de los GPCR

Cuando un receptor es activado por un ligando, se inician una serie de eventos intracelulares que modulan la función celular. Estos eventos dependen de la proteína G a la que se encuentran acoplados y de la maquinaria molecular intracelular. Las proteínas G están presentes en todos los organismos eucariotas y tienen un papel esencial en la transducción de señales debido a su asociación al receptor y a otras proteínas citoplasmáticas efectoras. Cada proteína G tiene una estructura heterotrimérica constituida por la subunidades α (39-46 KDa), β (37 KDa) y γ (8 KDa). La interacción del ligando con el receptor produce una serie de cambios conformacionales que modifican la estructura de la proteína G y que hacen que la subunidad α libere GDP y una GTP (Bourne *et al.* 1991) Al intercambiar GDP por GTP, la subunidad $G\alpha$ se activa y se desensambla tanto del receptor como del complejo estable $G\beta\gamma$ (Marinissen y Gutkind 2001). Tanto la subunidad $G\alpha$ como el complejo $G\beta\gamma$ son moléculas

señalizadoras de forma que activan o inhiben a moléculas efectoras, como las adenilato y guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, las fosfolipasas A₂ y C, y la fosfoinositol 3-quinasa entre otras. Ello da lugar a una activación o inhibición de una gran variedad de segundos mensajeros tales como el AMPc, GMPc, diacilglicerol (DAG), inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃), fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato, y los ácidos araquidónico y fosfatídico, por citar algunos (Marinissen y Gutkind 2001).

Dos ejemplos típicos de cascadas de señalización iniciadas por receptores acoplados a proteína G son las que conducen a la formación de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃)/DAG y AMPc como segundos mensajeros. Para la subunidad Gα_q, la proteína efectora diana es la PLC, enzima que hidroliza fosfoinositoides de membrana generando IP₃ y DAG como segundos mensajeros. El IP₃ aumenta la concentración de calcio intracelular vaciando los depósitos intracelulares, mientras que el DAG activa a la PKC. En el caso de las subunidades Gα_s o Gα_i, la proteína efectora es la adenilato ciclasa (AC), enzima que cataliza la conversión de ATP a AMPc, mientras Gα_s estimula esta enzima, la subunidad Gα_{i/o} la inhibe. El AMPc activa la PKA que igual que la PKC fosforila a múltiples y diversas proteínas (receptores, canales iónicos, enzimas o factores de transcripción) regulando así el funcionamiento celular (Marinissen y Gutkind 2001; Faure *et al.* 2004; Berridge 2009; Puzianowska-Kuznicka y Kuznicki 2009;).

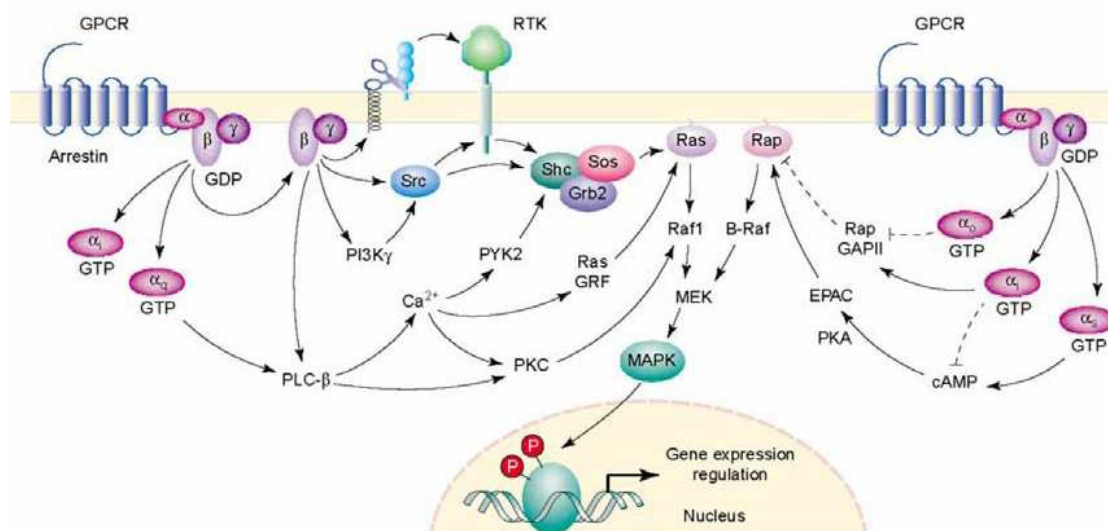


Figura 4. Representación de algunas de las vías que enlazan los GPCR con la vía de las MAPK (extraído de Marinissen y Gutkind 2001)

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

Sin embargo hay evidencias que indican que la señalización de los receptores de siete dominios transmembrana es mucho más compleja puesto que pueden activar la vía de las MAPKs a través de vías de señalización dependientes (Figura 4) e independientes de proteínas G (Daaka *et al.* 1998; Lefkowitz 1998; Luttrell *et al.* 1999; Beaulieu y Gainetdinov 2011). Un ejemplo paradigmático es la señalización mediada por la fosforilación del receptor por GRKs (*G protein-coupled Receptor Kinases*), la unión de β -arrestinas y el subsiguiente secuestro del receptor de la superficie celular (Krupnick y Benovic 1998), que no sólo es importante para la finalización de la señal, sino que también juega un papel importante en el intercambio entre las vías de señalización dependientes de proteína G e independientes como las utilizadas normalmente por receptores de factores de crecimiento (Luttrell *et al.* 1999).

Estudios relativamente recientes muestran que las β -arrestinas desempeñan un papel en la señalización celular que va más allá del simple desacoplamiento entre receptor y la proteína G. El hecho de que las β -arrestinas puedan interaccionar

directamente con tirosina quinasas de la familia de las Src y con componentes de la cascada de MAP quinasas (Perry y Lefkowitz 2002; Reiter *et al.* 2012), sugiere que las β -arrestinas pueden funcionar como adaptadores o *scaffolds* reclutando proteínas involucradas en la señalización de un determinado receptor (Figura 5). De esta manera, se ha demostrado la capacidad de diferentes tipos de receptores acoplados a proteína G de reclutar componentes de las cascadas de las JNKs o las ERKs, incluyendo las quinasas más relevantes de la cascada, como pueden ser JNK3, Raf-1, MEK1 o ERK1/2. Estos complejos pueden permanecer unidos incluso durante la internalización del receptor, presentando diferentes localizaciones subcelulares, presumiblemente en los endosomas hacia donde el receptor es conducido en su proceso de internalización y por lo tanto aproximando las quinasas a sus posibles substratos citosólicos. En este sentido, las β -arrestinas actúan como *scaffolds* permitiendo al receptor regular la actividad y la distribución de dichas quinasas en el interior celular, lo que puede tener unas implicaciones funcionales muy importantes (Violin y Lefkowitz 2007; Kelly *et al.* 2008; Reiter *et al.* 2012).

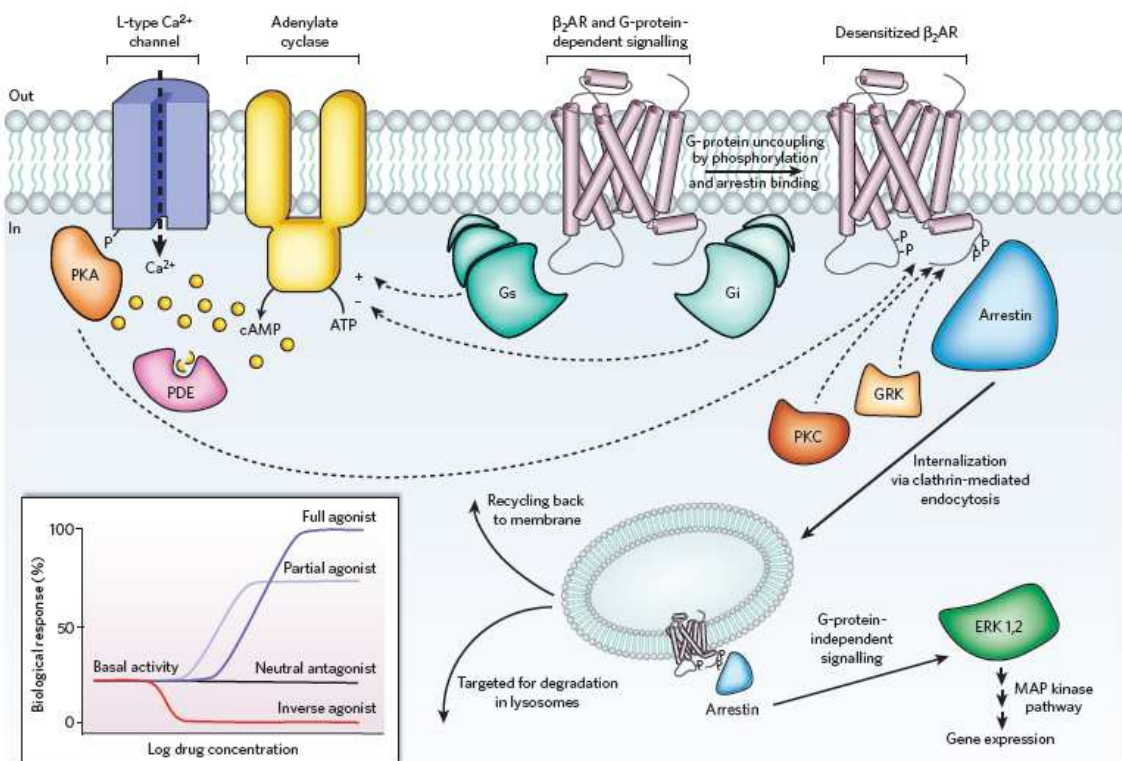


Figura 5. Transducción de señal en los receptores acoplados a proteína G (extraído de Rosenbaum *et al.* 2009)

1.1.4 Regulación de la actividad de los GPCR por desensibilización

La rápida atenuación de la respuesta del receptor tras su activación mediante unión de un agonista recibe el nombre de desensibilización (Golan *et al.* 2009; Moser *et al.* 2010). Este fenómeno puede manifestarse mediante diferentes mecanismos como el desacoplamiento del receptor de su proteína G en respuesta a la fosforilación del receptor (Hausdorff *et al.* 1989; Lohse *et al.* 1990; Ferguson 2001; Golan *et al.* 2009), la internalización de los receptores de la superficie celular a compartimentos intracelulares (Hermans *et al.* 1997; Trejo *et al.* 1998; Ferguson 2001), la disminución del número de receptores debido a la disminución del RNA mensajero y a la síntesis proteica, así como la degradación de los receptores preexistentes (Jockers *et al.* 1999; Pak *et al.* 1999). En el caso de las fosforilaciones, estos fenómenos tienen lugar en segundos, minutos en el caso de las endocitosis y horas cuando es regulada la expresión. La desensibilización del receptor puede ser completa, como ocurre en el sistema olfativo y visual o atenuada, disminuyendo la respuesta máxima, como ocurre con el receptor β_2 -adrenérgico (Sakmar 1998). La manera más rápida por la cual un GPCR se desacopla de la proteína G es a través de modificaciones covalentes en el receptor como consecuencia de su fosforilación por quinasas intracelulares, siendo de especial importancia las quinasas específicas para GPCR o GRK (Kelly *et al.* 2008; Golan *et al.* 2009).

La internalización de GPCR es un fenómeno común tras la estimulación por agonista. El tráfico de receptores a compartimentos endosomales permite la desfosforilación y reciclaje del receptor a la superficie celular (Krueger *et al.* 1997; Pierce y Lefkowitz 2001; Ferguson 2001; Gainetdinov *et al.* 2004; Boulay y Rabiet 2005). Parte de los receptores internalizados pueden degradarse tras la exposición prolongada al agonista, lo que implica que el receptor sea marcado para entrar en la vía de degradación (Bohm *et al.* 1997). El mecanismo de internalización de GPCR mejor caracterizado es a través de la fosforilación del receptor mediada por las proteínas quinasas específicas de GPCR (GRK) y β -arrestinas (Kelly *et al.* 2008). Una vez el receptor es fosforilado por GRK, la β -arrestina actúa como molécula reguladora que interactúa con componentes de la vía endocítica mediada por vesículas de clatrina. En respuesta a la activación de los GPCR, la β -arrestina citosólica transloca a la membrana plasmática uniéndose a los receptores a la vez que se inicia el proceso de endocitosis

mediado por clatrina (Ritter y Hall 2009) (Figura 6). Como se ha mencionado anteriormente, las β -arrestinas no sólo funcionan en el secuestro de GPCR para la desensibilización e internalización, sino como proteínas para transducir y compartimentar las señales alternativas (Golan *et al.* 2009). Estas proteínas tienen la habilidad de interactuar con una gran variedad de proteínas endocíticas y de señalización como las c-Src (Luttrell *et al.* 1999), MAPK y Raf (DeFea *et al.* 2000).

No obstante, no todos los GPCR necesariamente se internalizan por un mecanismo dependiente de β -arrestinas y clatrina. Existen evidencias experimentales que sugieren que los GPCR pueden internalizarse por vías endocíticas alternativas. Algunos GPCR se han encontrado en estructuras de membrana ricas en colesterol denominadas caveolas (Chun *et al.* 1994; Huang *et al.* 1997; Burgueño *et al.* 2003). Estos dominios también son dominios de señalización donde los GPCR pueden localizarse e interactuar específicamente con proteínas de señalización (Ostrom y Insel 2004). Además, las caveolas tienen un papel clave en la desensibilización y tráfico de los receptores ya que el uso de agentes bioquímicos que disrumen estas estructuras son efectivos en la inhibición de la endocitosis de ciertos GPCR (Ginés *et al.* 2001; Escriche *et al.* 2003; Kong *et al.* 2007; Wu *et al.* 2008). Por otra parte, ciertos receptores son susceptibles de usar una tercera vía endocítica alternativa, si bien no se han identificado ni las proteínas de cubierta, ni las proteínas adaptadoras para la generación de estas vesículas (Claing *et al.* 2000).

Una vez internalizados, los receptores son marcados para entrar en vías de reciclaje o de degradación. Algunos GPCR, entre los que se incluye el receptor β_2 -adrenérgico, pueden ser reciclados a la membrana plasmática, como receptores totalmente competentes después de unos minutos de haber sido internalizados (Pippig *et al.* 1995). Otros receptores, como el receptor de vasopresina tipo 2, es retenido dentro de la célula durante un cierto periodo de tiempo antes de ser reciclado a la membrana celular (Innamorati *et al.* 2001), mientras que algunos, como los receptores de σ -opioides o de trombina son mayoritariamente degradados (Tsao y von Zastrow 2000). Sin embargo, para la mayoría de GPCR una parte es reciclada y otra parte es degradada, como ocurre con los receptores de adenosina (Escriche *et al.* 2003).

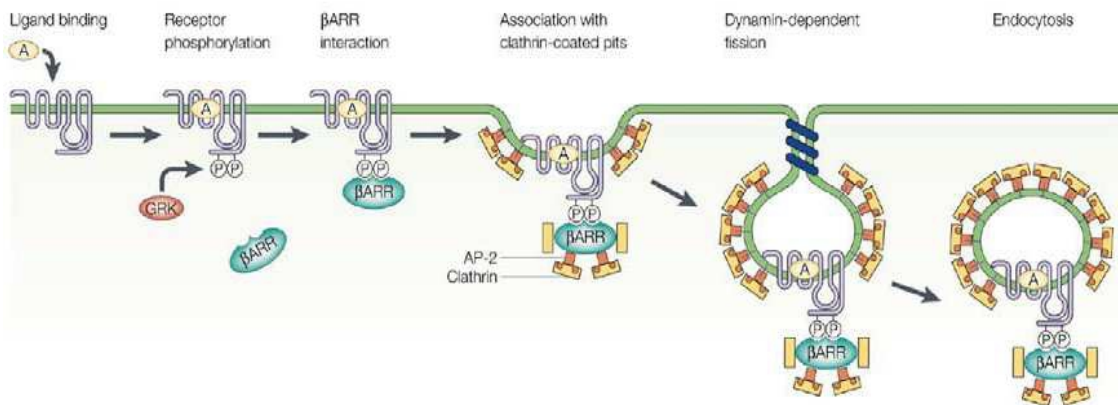


Figura 6. Ejemplo de un modelo propuesto para la desensibilización, internalización y downregulation de los GPCR (extraído de Pierce y Lefkowitz 2001)

1.1.5 Actividad constitutiva y nomenclatura de los ligandos de los GPCR

La activación de un receptor acoplado a proteína G se basa en un cambio conformacional de la estructura terciaria debido a la unión al receptor de un ligando agonista. El receptor pasa de una conformación inactiva a una activa, existiendo una constante de equilibrio entre los dos estados del receptor. La actividad constitutiva que presentan estos receptores representa una isomerización del receptor a la conformación activa en ausencia de ligando (Seifert y Wenzel-Seifert 2002). Como consecuencia se promueve el intercambio GDP-GTP en la proteína G acoplada, aumentando así la actividad basal de dicha proteína G y de los siguientes sistemas efectores (Costa y Herz 1989).

Esta actividad constitutiva es inhibida por los compuestos denominados agonistas inversos, los cuales actúan sobre el receptor de manera que estabilizan la conformación inactiva y por lo tanto minimizan el intercambio GDP-GTP. Estos compuestos actúan de forma opuesta a los agonistas, cuya función es estabilizar al receptor en la conformación activa y, por lo tanto, inducir su señalización intracelular. Se ha propuesto la existencia de múltiples conformaciones de los receptores con distintas funciones biológicas (Seifert y Wenzel-Seifert 2002). Estas conformaciones estarían estabilizadas por diferentes tipos de compuestos, siendo la más favorable para la señalización aquella conformación del receptor estabilizada por el agonista; seguidas por los agonistas parciales, que serían compuestos con una menor eficiencia para

estabilizar el receptor en la conformación más activa y que por lo tanto promueven un menor intercambio GDP-GTP. A continuación vendrían los antagonistas neutros o simplemente antagonistas que no alterarían el equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva, pero que tienen la capacidad de bloquear el efecto de los agonistas y de los agonistas inversos. Por último, estarían los agonistas inversos parciales y los agonistas inversos, que serían capaces de estabilizar al receptor en su estado inactivo, en un menor y mayor grado respectivamente, reduciendo la actividad basal o constitutiva del receptor (Figura 7).

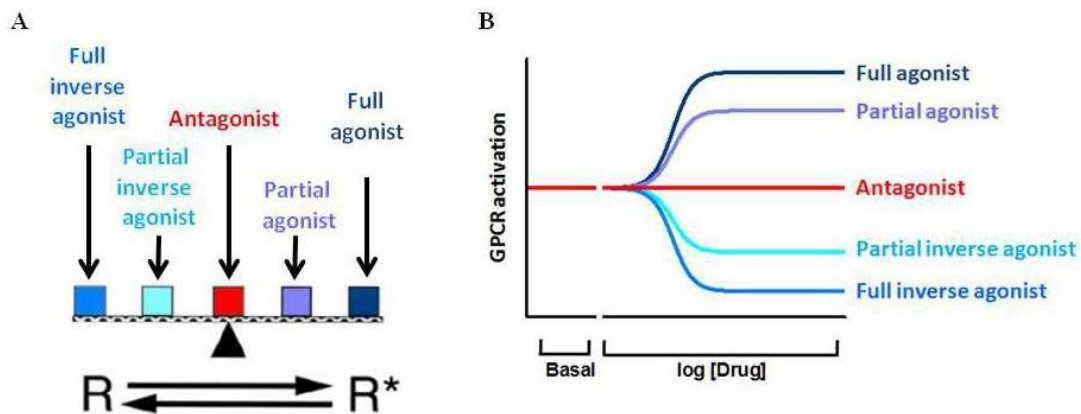


Figura 7. Activación de los receptores acoplados a proteína G según el modelo de dos estados. A) El modelo de dos estados asume que el receptor isomeriza desde un estado inactivo R a uno activo R*. B) Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre la actividad constitutiva del receptor (extraído y modificado de Seifert y Wenzel-Seifert 2002)

Los ligandos también se pueden clasificar en función del lugar al que se unen al receptor. La mayoría de los ligandos conocidos de GPCR que actúan como agonistas, antagonistas o agonistas inversos, se unen al mismo dominio del receptor reconocido por los agonistas endógenos, es decir, el lugar de unión ortostérico (Neubig *et al.* 2003). En cambio, muchos GPCR poseen centros alostéricos, topográficamente distintos del centro ortostérico. Esto ha llevado a la identificación de ligandos que actúan como moduladores alostéricos, que pueden regular indirectamente la actividad de los ligando ortostéricos y/o mediar directamente los efectos de agonistas/agonistas inversos (Christopoulos y Kenakin 2002; Kenakin 2010).

1.1.6 Los GPCR como dianas terapéuticas

Los GPCR han sido el centro de interés de fisiólogos y farmacólogos mucho antes de que se supiera que estaban acoplados a proteína G (Fredholm *et al.* 2007; Lefkowitz 2007). Estos receptores representan la familia de proteínas de mayor impacto social, terapéutico y económico. Hoy en día, más del 50% de los fármacos, con unas ventas anuales en el mundo que superan los 50 billones de dólares, regulan la función de los GPCR, y un 30% de estos fármacos están directamente dirigidos a los GPCR (Jacoby *et al.* 2006; Lundstrom 2006). Los GPCR están involucrados en una amplia diversidad de enfermedades, como son: alergias, disfunción cardiovascular, obesidad, cáncer, diabetes, y una variedad de trastornos del sistema nervioso central. Dado que los GPCR representan alrededor del 1% del genoma humano, sólo una proporción muy pequeña de todos los GPCR son actualmente diana de fármacos.

| Acción | Nombre comercial | Entidad molecular | Compañía | Indicación terapéutica | Ventas mundiales (Millones USD) |
|---|------------------|-------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------|
| Antagonista de H ₁ | Allegra/Telfast® | Fexofenadine | Sanofi-Aventis | Alergias | 1792 |
| Antagonista de AT ₁ | Diovan® | Valsartan | Novartis | Hipertensión | 2214 |
| Antagonista de H ₂ | Gaster® | Famotidine | Yamanouchi | Úlcera gástrica | 656 |
| Agonista de 5HT _{1D} | Imigran® | Sumatriptan | GlaxoSmithKline | Migraña | 1454 |
| Agonista de LH-RH | Leuplin/Lupron® | Leuprorelin | Takeda/Abbot | Cáncer | 904 |
| Agonista de GABA _B | Neurontin® | GABApentin | Pfizer | Dolor neurológico | 2480 |
| Antagonista de P2Y ₁₂ | Plavix® | Clopidogrel | Bristol-Myers Squibb | Ictus | 5277 |
| Antagonista de 5HT ₂ /D ₂ | Risperdal® | Risperidone | Johnson&Johnson | Esquizofrenia | 371 |
| Agonista de β ₁ | Serevent® | Salmeterol | GlaxoSmithKline | Asma | 679 |
| Antagonista de 5HT ₂ /D ₁ /D ₂ | Zyprexa® | Olanzapine | Eli Lilly | Esquizofrenia | 4905 |

Tabla 1. Algunos de los fármacos más vendidos relacionados con GPCR (extraído y modificado de Jacoby *et al.* 2006)

Por lo tanto, existe mucho interés en la identificación de nuevos receptores que puedan ser utilizados para el desarrollo de fármacos donde las necesidades médicas siguen sin satisfacerse (Lin y Civelli 2004; Fredholm *et al.* 2007). En la Tabla 1 se muestra un pequeño ejemplo de los fármacos más vendidos dirigidos a GPCR, donde se observa el amplio rango de indicaciones terapéuticas que cubren.

1.1.7 Interacciones moleculares de los GPCR con otras proteínas

El correcto funcionamiento de la célula depende, entre otros factores, de los estímulos que recibe desde su entorno extracelular más inmediato. Éste es un proceso altamente regulado en el que participan un gran número de moléculas, que interactúan entre ellas de forma rápida o bien formando complejos relativamente estables. Ello permite una serie de respuestas adecuadas al estado general de una célula o de un sistema en un momento determinado. Además de las interacciones clásicas proteína-proteína intracelulares involucradas en la transducción de la señal, se han descrito un gran número de interacciones que son la base para la formación de complejos macromoleculares responsables de la localización de receptores en determinados dominios celulares. Muchos GPCR tienen la capacidad de interactuar con una amplia variedad de proteínas. Estas interacciones determinan diferentes propiedades del receptor, como por ejemplo: la compartimentalización celular, la selección de una señal, la promoción de ensamblajes de complejos que integran una función y el favorecimiento de la internalización, entre otras (Franco *et al.* 2003).

La topología de los GPCR permite varias caras potenciales para posibilitar distintos tipos de interacciones proteína-proteína. Así, en el espacio extracelular, donde tiene lugar la unión a ligando, las regiones de los GPCR implicadas en la interacción con proteínas son en la mayoría de los casos, las secuencias presentes en el extremo amino terminal, ya que los bucles extracelulares son muy cortos. Existen evidencias crecientes de que las interacciones receptor-proteína extracelulares pueden jugar un papel importante en la farmacología de los GPCR. Un ejemplo lo constituye la adenosina desaminasa (ADA) que puede actuar como ecto-enzima anclada a diferentes proteínas tales como los receptores de adenosina A_1 , A_{2A} y A_{2B} (Ciruela *et al.* 1996; Saura *et al.* 1996; Herrera *et al.* 2001; Gracia *et al.* 2011).

En la cara intracelular, tanto el extremo carboxilo terminal como el tercer bucle intracelular pueden ser considerablemente grandes, razón por la que estas regiones son las más probables para la interacción con otras proteínas implicadas en el proceso de señalización (como las proteínas G) o en la localización subcelular, mediadas por asociación a proteínas del citoesqueleto o a las relacionadas con el tráfico de receptores (Figura 8).

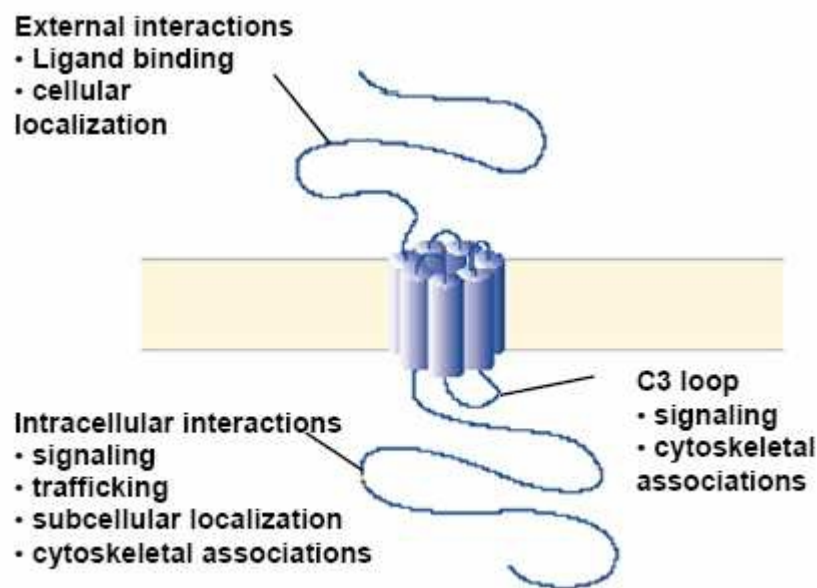


Figura 8. Representación esquemática de un GPCR con las regiones identificadas implicadas en la interacción con otras proteínas y su función genérica (extraído de Bouvier 2001)

Los polipéptidos que anclan estos receptores al citoesqueleto constituyen un ejemplo de proteínas que interactúan con los GPCR, como es el caso de la α -filamina con el receptor D₂ de dopamina (Lin *et al.* 2001), y la α -actinina con el receptor de adenosina A_{2A} (Burgueño *et al.* 2003), y con el receptor metabotrópico de glutamato tipo 5b (mGlu_{5b}R) (Cabello *et al.* 2007). También encontramos la familia de proteínas *Shank* con el receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGlu1R) o el receptor de somatostatina tipo 2 (SSTR2) (Tu *et al.* 1999; Böckers *et al.* 2001). Las proteínas de andamio o *scaffolds* (*scaffolding proteins*) son ricas en dominios tales como los SH2 (Src-homology 2), SH3 (Src-homology 3) o PDZ (*Post-synaptic-Density-95/Disclarge/ZO1*), que se han conservado a lo largo de la evolución y que son los responsables de las interacciones con otras proteínas. En la última década se han

descrito interacciones entre los GPCR y proteínas que contienen el dominio PDZ, las cuales juegan un papel clave en la modulación de la señal, ya que definen una composición molecular de complejos de señalización en microcompartimentos y, en algunos casos, la localización precisa de estos complejos dentro de la célula. Así, por ejemplo, la interacción del receptor β_2 -adrenérgico con el factor regulador del intercambio Na^+/H^+ (NHERF) podría controlar la internalización y tráfico de este receptor (Shenolikar *et al.* 2001). También se ha demostrado que la interacción de la proteína Homer-1b con el receptor mGlu₁R modula la movilización de estos receptores hacia la membrana (Roche *et al.* 1999). Por otro lado, se ha comprobado que la espinofilina (otra proteína con dominio PDZ) puede interaccionar con los receptores D₂ de dopamina y α_2 -adrenérgico a través de un nuevo dominio diferente del PDZ, actuando como una proteína de andamio que une estos GPCR con proteínas de señalización como PP-1 (Smith *et al.* 1999; Richman *et al.* 2001).

1.2 OLIGOMERIZACIÓN DE LOS GPCR

La autoasociación de proteínas para formar dímeros o bien oligómeros de orden superior es un factor clave en la regulación de proteínas tales como enzimas, receptores, canales iónicos, factores de transcripción etc. (Marianayagam *et al.* 2004).

Los GPCR, dadas sus características estructurales y su localización subcelular, además de interactuar con otras proteínas del lado intracelular y del lado extracelular, tal como se ha descrito anteriormente (véase 1.1.7), también pueden exhibir interacciones proteína-proteína a nivel de membrana plasmática con otros receptores o canales iónicos (Franco *et al.* 2003). Desde mediados de los años 90, diversos estudios han demostrado la oligomerización de numerosos GPCR (George *et al.* 2002). Hoy en día se acepta que la oligomerización es un hecho común en la biología de estos receptores y que pueden formar homodímeros, heterodímeros y/u oligómeros de orden superior (Bouvier 2001; Devi 2001; Rios *et al.* 2001; Agnati *et al.* 2003; Franco *et al.* 2003; Terrillon y Bouvier 2004; Agnati *et al.* 2005; Prinster *et al.* 2005; Pin *et al.* 2007; Carriba y *et al.* 2008; Ferré *et al.* 2009; Rozenfeld y Devi 2010). La homodimerización se define como la asociación física entre proteínas idénticas, mientras que la heterodimerización es la asociación entre proteínas distintas. El término dímero se utiliza con frecuencia entendiendo que es la forma más simple de una unidad estructural y funcional oligomérica, debido a la dificultad que existe en distinguir entre dímeros y oligómeros de orden superior con las técnicas actuales. Los dímeros/oligómeros pueden presentar características funcionales diferentes a las de los receptores que los constituyen. Así la oligomerización confiere nuevas propiedades a los GPCR, lo que establece un posible mecanismo para generar funciones distintas en estos receptores. Este fenómeno ha dado lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas (Ferré *et al.* 2007; Pin *et al.* 2007; Ferré *et al.* 2009). En la tabla 2 se describen algunos ejemplos de homodímeros y de heterodímeros de diversos receptores.

Las interacciones entre GPCR son cruciales para entender el variado *cross-talk* que se observa entre receptores de neurotransmisores. La oligomerización de receptores neuronales permite formular hipótesis sobre el alto grado de diversidad y plasticidad, que es característico de una estructura altamente organizada y compleja como es el cerebro. Se ha descrito un nivel superior de organización por el que los receptores

acoplados a proteína G forman estructuras compuestas no sólo por homo- o heterodímeros, sino por complejos supramoleculares constituidos por varios receptores y una variedad de proteínas que modifican la actividad del receptor (RAMPs: *Receptor Activity Modifying Proteins*).

Estos complejos interactúan tanto a lo largo de la membrana (interacciones horizontales), como a través de ella (interacciones verticales), y al ser activados por hormonas o neurotransmisores se redistribuyen en la membrana y dan lugar a *clusters*. Los *clusters* supondrían un nivel superior de regulación de los receptores y enzimas asociadas y podrían ser regulados por otros receptores en estos complejos y también por otras moléculas que no interactúan físicamente con ellos, pero sí se comunican entre ellos en el *cluster* (Franco *et al.* 2003).

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

| Homodímeros | Heterodímeros |
|-------------------------------|---|
| Adenosina A ₁ | Adenosina A ₁ -Dopamina D ₁ |
| Adenosina A _{2A} | Adenosina A ₁ - mGlu ₁ |
| Dopamina D ₁ | Adenosina A ₁ - Purinérgico P2Y ₁ |
| Dopamina D ₂ | Adenosina A _{2A} - Dopamina D ₂ |
| Dopamina D ₃ | Adenosina A _{2A} - mGlu ₅ |
| Histamina H ₂ | Angiotensina AT ₁ -AT ₂ |
| Histamina H ₄ | Dopamina D ₁ - Dopamina D ₃ |
| Melatonina MT ₁ | Melatonina MT ₁ - MT ₂ |
| Citoquina CCR ₂ | Muscarinico M ₂ - M ₃ |
| Serotonina 5-HT _{1B} | Citoquina CCR ₂ - CCR ₅ |
| Vasopresina V ₂ | Serotonina 5-HT _{1B} - 5-HT _{1D} |
| GABA _{BR1} | TIR ₁ - TIR ₃ |

Tabla 2. Algunos ejemplos de homodímeros y heterodímeros de GPCR.

1.2.1 Arquitectura de los dímeros de GPCR

Para explicar el fenómeno de la dimerización de los receptores acoplados a proteína G se pueden considerar dos posibilidades: que estas interacciones sean indirectas o bien que sean directas, implicando un contacto entre ambos receptores. En el caso de las interacciones indirectas entre GPCR hace falta la mediación de terceras proteínas, que hacen de puente, tales como las proteínas del citoesqueleto. En las interacciones indirectas, los dominios intracelulares de los GPCR se unen a un gran número de proteínas citosólicas, algunas de las cuales, por sus características intrínsecas, han sido propuestas como posibles candidatas a participar en la dimerización de los receptores con los que interaccionan. Muchas de estas proteínas son proteínas de andamio o *scaffolding proteins*, que proporcionan una estructura compleja en la cual diversos receptores pueden interaccionar entre ellos y con otras proteínas involucradas en la transducción de señal, controlando la velocidad y la especificidad de dicha señalización (Ciruela *et al.* 2005).

Las interacciones directas entre miembros de la familia de GPCR no precisan de otras proteínas y se cree que, en la mayoría de casos los oligómeros se forman en el retículo endoplasmático, por lo que no son modulables por ligando, entendiendo la modulación como la formación o destrucción del oligómero. La gran complejidad estructural que existe en esta superfamilia no permite pensar en un único mecanismo de interacción directa. Así pues, las interacciones directas pueden tener lugar mediante enlaces covalentes (puentes disulfuro) y/o no covalentes (interacciones hidrofóbicas y/o electrostáticas) entre los dominios transmembrana y/o los dominios intracelulares de los receptores (Figura 9) (Bouvier 2001).

Se han encontrado distintas interacciones intermoleculares involucradas en la formación de varios homómeros y heterómeros, que demuestran que en la oligomerización de los GPCR existen múltiples sitios de interacción implicados en el ensamblaje y en la estabilización de los dímeros (Maggio *et al.* 1993; Hebert *et al.* 1996; Ng *et al.* 1997; Romano *et al.* 1996; Cvejic y Devi 1997; White *et al.* 1998; Jordan y Devi 1999; Robbins *et al.* 1999; Gouldson *et al.* 2000; Margeta-Mitrovic *et al.* 2000; Scarselli *et al.* 2000; Schulz *et al.* 2000; Romano *et al.* 2001; Woods y Huestis

2001; Ciruela *et al.* 2004; Ferrada *et al.* 2008; Navarro *et al.* 2008; Ferrada *et al.* 2009; Navarro *et al.* 2009; Navarro *et al.* 2010b; Moreno *et al.* 2011b; Moreno *et al.* 2011a).

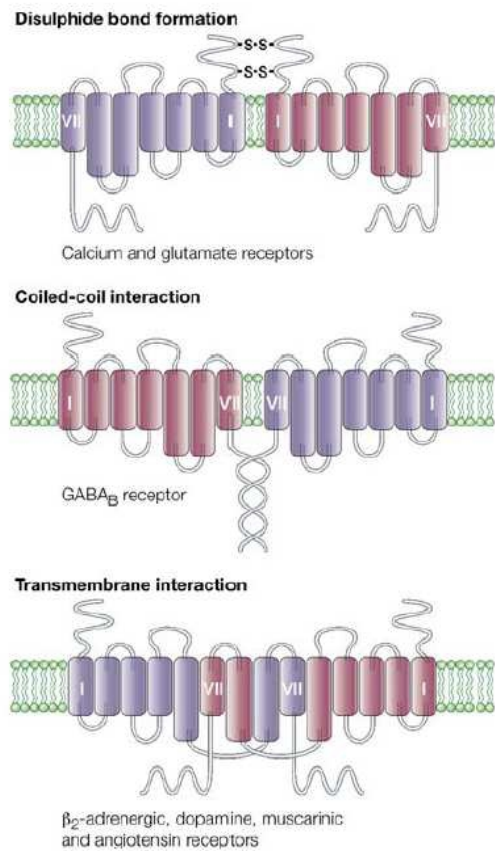


Figura 9. Determinantes moleculares de la dimerización de los GPCRs. Varios tipos de interacciones intermoleculares han sido descritas, a través de las cuales los GPCR forman dímeros: a) los puentes disulfuro se han descrito para la dimerización entre receptores metabotrópicos de glutamato, b) interacciones mediante enlaces no covalentes de los extremos carboxi terminales entre los receptores GBR1 y GRBR2 gabaérgicos, c) interacciones de las hélices transmembrana que forman especialmente los receptores de la familia A (extraído de Bouvier *et al.* 2001)

1.2.2 Papel funcional de la oligomerización de los GPCR

Como se detallará posteriormente (véase 1.2.4), la disponibilidad de un gran número de técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR ha facilitado enormemente la investigación del papel funcional de estos receptores. La dimerización está implicada en la regulación de la funcionalidad del receptor a diferentes niveles, desde la modulación de la expresión del receptor en la superficie celular hasta el hecho de conferir nuevas propiedades farmacológicas a los receptores expresados en el dímero. Esto ha proporcionado una nueva perspectiva para considerar cual es la unidad de señalización de los GPCR, así como para el desarrollo de ligando que actúan a través de este tipo de receptores.

Aunque en muchos casos la relevancia fisiológica no se conoce completamente, diversos estudios llevados a cabo en sistemas de expresión heterólogos han sugerido

distintos papeles funcionales para la oligomerización de GPCRs (Figura 10). Por ejemplo, la oligomerización puede estar implicada en la ontogénesis de los GPCR, es decir, en el control de calidad del plegamiento y de la destinación a la membrana de receptores sintetizados *de novo* (Figura 10.1). Asimismo, en algunos casos, se ha observado una regulación de la formación/separación de oligómeros presentes en la membrana plasmática mediada por ligando (Figura 10.2). También, se ha constatado que la oligomerización confiere diversidad farmacológica, ya que la unión de un ligando a un receptor del dímero puede influir en la unión de otro ligando al segundo receptor dentro del dímero (Ferré *et al.* 2007; Franco *et al.* 2008b) (Figura 10.3). La oligomerización también puede modificar las propiedades de señalización de un determinado ligando afectando la selectividad de interacción entre el receptor correspondiente y su proteína G, lo que origina una potenciación, atenuación o acoplamiento con otra proteína G (Figura 10.4). Finalmente, también se ha visto que la oligomerización puede alterar el patrón endocítica para un determinado receptor (Terrillon y Bouvier 2004) (Figura 11.5).

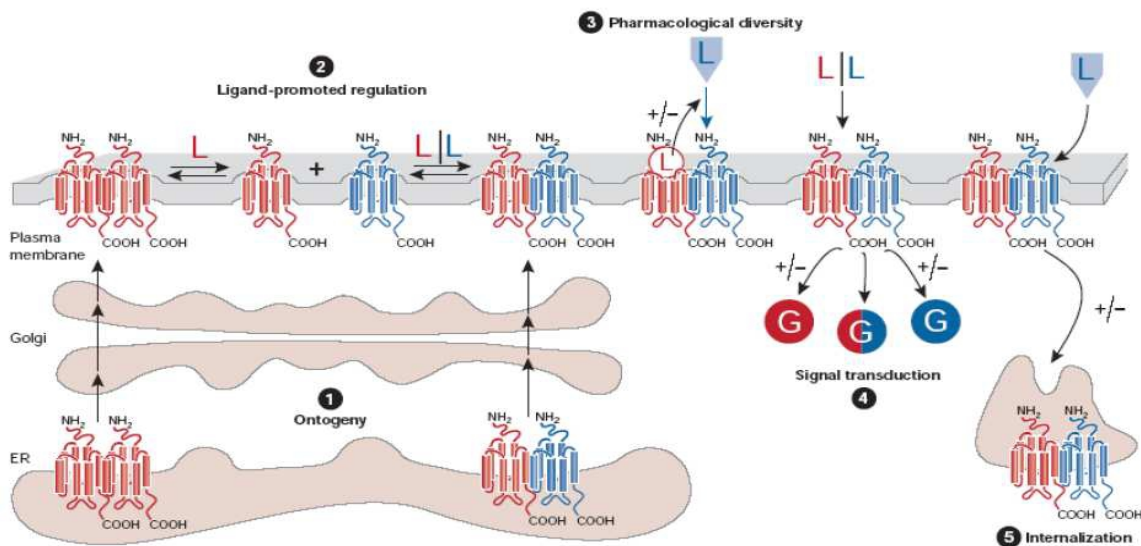


Figura 10. Posibles papeles funcionales de la oligomerización de GPCRs
ER, retículo endoplasmático, L, ligando (extraído de Terrillon y Bouvier 2004)

1.2.3 Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR

Las primeras evidencias de la existencia de homodímeros entre GPCR se obtuvieron a partir de estudios farmacológicos. Las complejas curvas de unión, tanto de agonistas como de antagonistas de estos receptores se interpretaron considerando la

existencia de una cooperatividad positiva o negativa, que se podía explicar mediante interacciones entre los sitios de unión de los receptores dentro de complejos diméricos u oligoméricos (Limbird *et al.* 1975; Mattera *et al.* 1985; Hirschberg y Schimerlik, 1994; Wreggett y Wells, 1995; Franco *et al.* 1996)

Una evidencia contundente de la existencia de heteroligómeros la constituyen los cambios cinéticos en la unión de radioligandos a un receptor provocados por la unión de ligandos no radioactivos al otro receptor del heterómero, utilizando preparados de membranas de células o de tejido que expresen los dos receptores. En preparaciones de membrana no hay ninguna maquinaria celular que pueda producir un *cross-talk* indirecto (por ejemplo, un *cross-talk* a nivel de segundos mensajeros) y la existencia de una modulación a nivel de unión de radioligandos sólo puede ser explicada por una interacción molecular entre ambos receptores. En estos casos la unión de un ligando a un receptor induce cambios conformacionales en el otro receptor que modulan su capacidad de unir a su ligando y estos cambios conformacionales sólo se pueden producir si ambas proteínas interaccionan molecularmente directa o indirectamente (Franco *et al.* 2007; Franco *et al.* 2008b). En muchos casos esta clase de interacción se ha encontrado en tejido nativo, lo que puede ser interpretado como un indicador de la existencia de receptores heteroméricos *in vivo* (Gonzalez-Maeso *et al.* 2008; Marcellino *et al.*, 2008; Navarro *et al.* 2010b; Navarro *et al.* 2010a; Moreno *et al.* 2011b; Moreno *et al.* 2011a).

El elegante trabajo de Maggio (Maggio *et al.* 1993; Maggio *et al.* 2003), utilizando quimeras y receptores mutantes de varios GPCR, que ponía de manifiesto que estos receptores pueden funcionar como dímeros, fue un estudio pionero en la utilización de mutantes para demostrar la oligomerización de GPCR. En esta línea se ha observado que diversos receptores mutantes se comportan como mutantes dominante negativos cuando se expresan con el receptor *wild-type* (Benkirane *et al.* 1997; Bai *et al.* 1998; Zhu y Wess 1998). En estos casos, la respuesta observada se explica únicamente por la dimerización entre el receptor *wild-type* y el receptor inactivo.

Una de las técnicas bioquímicas clásicamente más usadas para investigar la homodimerización de GPCR ha sido la coimmunoprecipitación de receptores marcados

sobre epítomos diferentes. El primer estudio en el que se utilizó esta aproximación experimental se demostró la interacción específica entre los receptores β_2 -adrenérgicos (Hebert *et al.* 1996).

Desde entonces, estrategias similares han sido usadas para documentar la homodimerización de los receptores metabotrópico mGlu5R (Romano *et al.* 1996), δ -opioides (Cvejic y Devi, 1997) y los receptores de serotonina 5-HT_{2C} (Herrick-Davis *et al.* 2004) y 5-HT₄ (Berthouze *et al.* 2007), entre otros.

Los experimentos de coimmunoprecipitación también han sido utilizados para demostrar la heteromerización entre receptores del mismo neurotransmisor, como GABA_{B1} y GABA_{B2} (Jones *et al.* 1998; Kaupmann *et al.* 1998; White *et al.* 1998) o como los δ - y κ -opioides (Jordan y Devi, 1999), e incluso entre receptores menos relacionados como los receptores de adenosina A₁ y de dopamina D₁ (Gines *et al.* 2000), los de angiotensina AT₁ y bradiquinina B₂ (AbdAlla *et al.* 2000), δ -opioide y β_2 -adrenérgico (Jordan *et al.*, 2001), A₁ de adenosina y metabotrópico mGlu1R (Ciruela *et al.* 2001), A_{2A} de adenosina y metabotrópico mGlu5R (Ferré *et al.* 2002) o los receptores de cannabinoides CB₁ y de dopamina D₂ (Kearn *et al.* 2005). Aunque se utiliza comúnmente para estudiar las interacciones proteína-proteína, la coimmunoprecipitación de GPCR requiere de su solubilización mediante detergentes, lo que no permite descartar que los dímeros observados puedan ser agregados artefactuales por una solubilización incompleta, debida a la naturaleza hidrofóbica de estos receptores.

En 1948 Theodor Förster formuló la teoría de transferencia de energía por resonancia (Förster 1948) que más tarde fue aplicada al estudio de interacciones entre GPCR. Esta aproximación biofísica está basada en la transferencia de energía no radiante entre dos dipolos electromagnéticos, es decir, desde un cromóforo en estado excitado (dador energético) a una molécula cercana que absorbe (aceptor). En el caso de la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET; *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), tanto el dador como el aceptor son moléculas fluorescentes, mientras que en la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET; *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) el dador es bioluminiscente y el aceptor fluorescente (Bouvier *et al.* 2007; Gandía *et al.* 2008; Ciruela *et al.* 2010; Ferré *et al.*

2010; De 2011; Schaferling y Nagl 2011). Para que este fenómeno tenga lugar es necesario que se cumplan dos requisitos. El primero, consiste en que el espectro de emisión del dador y el espectro de excitación del aceptor se solapen, de forma que el dador no emite completamente la energía que debiera, si no que transfiere parte de su energía de emisión de forma directa al fluoróforo aceptor, el cual emite como si hubiera sido excitado directamente. El segundo requisito para que tenga lugar el fenómeno de transferencia de energía es que tanto el dador como el aceptor han de estar muy próximos en el espacio ($<100 \text{ \AA}$ o 10 nm). Así, a diferencia de la coimmunoprecipitación, las técnicas de transferencia de energía ofrecen una aproximación única que permite detectar la dimerización de proteínas en células vivas, sin perturbar el entorno donde este fenómeno ocurre.

La dependencia crítica de la distancia entre dador y aceptor para la transferencia de energía, donde la eficiencia de la transferencia disminuye con la sexta potencia de la distancia, hace que los sistemas de BRET/FRET sean los elegidos para monitorizar las interacciones proteína-proteína en cultivos celulares. Hay que destacar que entre 10 y 100 \AA se encuentran la mayor parte de complejos multiproteicos biológicos de una célula (Stryer 1978; Sheng y Hoogenraad 2007).

Para la técnica de FRET se utilizan las diferentes variantes de la proteína verde fluorescente (GFP: *Green Fluorescence Protein*) obtenidas por mutación. Estas mutaciones confieren diferentes propiedades espectrales, de forma que utilizando dos formas diferentes de mutantes con las características espectrales adecuadas, fusionadas a las proteínas en estudio, permite determinar si éstas están lo suficientemente cercanas como para transferirse energía (Pfleger y Eidne 2005; Ferré *et al.* 2010; Schaferling y Nagl 2011). La pareja más ampliamente utilizada para los experimentos de FRET son las variantes YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) y GFP². Esta última variante de la GFP ha sido optimizada para ser usada como pareja de FRET con la YFP. La GFP² se excita a 400 nm y emite a 510 nm , mientras que la YFP se excita a 485 nm y emite a 530 nm . De esta forma, tal y como se muestra en la figura 12, la excitación de la células que expresan la proteína de fusión receptor-GFP² con un láser de una longitud de onda de $393\text{-}403 \text{ nm}$, produce la emisión de energía a 510 nm , que es capaz de excitar a la proteína de fusión receptor-YFP, cuya emisión a 530 nm es cuantificable. Debido a que hay un cierto solapamiento entre los espectros de emisión de ambas proteínas de fusión,

es necesario separar los dos espectros de emisión para cuantificar la señal de FRET (Zimmermann *et al.* 2002).

En la técnica de BRET se utiliza el enzima *Renilla luciferasa* (*Rluc*) fusionado a uno de los receptores. Se produce la degradación catalítica del sustrato coelenterazina H por la luciferasa en presencia de oxígeno, de forma que se genera luz que al ser transferida a una variante de la proteína GFP fusionada al otro receptor, ésta emite fluorescencia a su longitud de onda característica si ambas proteínas están lo suficientemente cercanas (Bouvier *et al.* 2007; Ciruela *et al.* 2010; Ferré *et al.* 2010; De 2011).

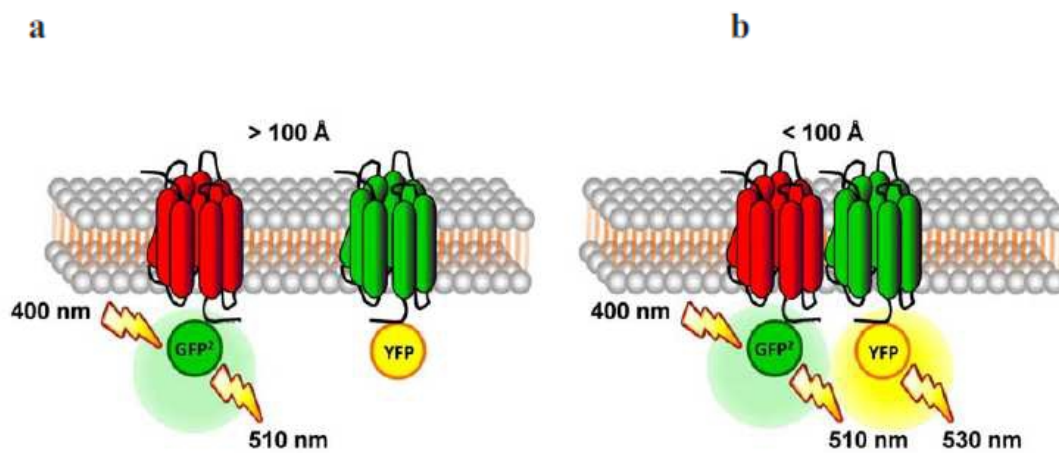


Figura 11. Representación esquemática del fenómeno de FRET

En el estudio de la dimerización de GPCRs, se generan proteínas de fusión que consisten en la unión de la proteína fluorescente GFP o sus variantes (por ejemplo YFP) en el extremo carboxi terminal de un receptor y la proteína luminiscente *Rluc* en el extremo carboxi terminal del otro receptor y, al igual que en la técnica de FRET, se co-expresan ambas proteínas de fusión en células vivas. Como se muestra en la figura 11a, en ausencia de dimerización, la adición del sustrato coelenterazina H genera una señal bioluminiscente característica, mientras que, como se muestra en la figura 11b, si se produce dimerización entre ambos receptores, la energía es transferida de la *Rluc* a la proteína fluorescente, dando lugar a la aparición de una señal adicional fluorescente con un pico de emisión característico de la variante usada.

Hasta la fecha se han descrito dos variantes principales de esta técnica, la que se conoce como BRET¹ y la denominada BRET². Aunque el principio biofísico de ambas técnicas es el mismo, difieren por el sustrato que cataliza la *Rluc* y por la proteína aceptora. En el BRET¹ el sustrato que se usa es la coelenterazina H, que al ser metabolizada por la *Rluc* genera luz con un pico de emisión a 480 nm; emisión que permite excitar a la YFP (ya que se solapa con su pico de excitación), de forma que esta emite a 530 nm. En el BRET² el sustrato es *DeepBlueC* que al ser oxidado por la *Rluc* emite una luz a 400 nm de forma que puede excitar a la GFP²; en este caso la longitud de onda a la que emite esta variante de la GFP es 510 nm (Figura 12).

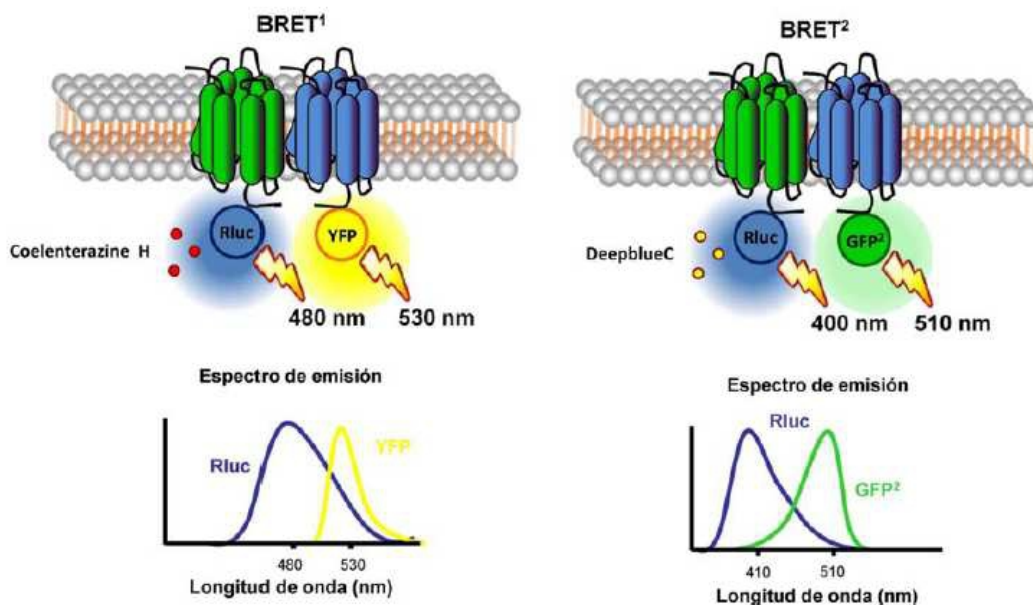


Figura 12. Representación esquemática de los fenómenos de BRET¹ y BRET² con sus correspondientes espectros de emisión

Mediante técnicas de transferencia de energía se ha demostrado la existencia de homodímeros de los receptores β_2 -adrenergico (Angers *et al.* 2000), δ -opioides (McVey *et al.* 2001) y A_{2A} de adenosina (Canals *et al.* 2004) entre muchos otros. También se ha realizado una aproximación similar para el estudio de heterómeros de receptores acoplados a proteína G, como por ejemplo entre los receptores de somatostatina SST_{2A} R y SST_{1B} R (Rocheville *et al.* 2000), los receptores de somatostatina SST_{1B} R y los D₂ de dopamina (Rocheville *et al.* 2000), los receptores A_{2A} de adenosina y D₂ de dopamina (Canals *et al.* 2003), los receptores de dopamina D₁ y D₃ (Fiorentini *et al.*

2008; Marcellino *et al.* 2008), los receptores A_{2A} de adenosina y CB₁ de cannabinoides (Carriba *et al.* 2007), los receptores D₁ de dopamina y H₃ de histamina (Ferrada *et al.* 2009) o los receptores D₁ de dopamina y los sigma-1 (Navarro *et al.* 2010b) entre otros. En los últimos años se han desarrollado multitud de variantes de estas técnicas (véase Ciruela 2008 como revisión) entre las que cabe destacar la técnica de SRET (*Sequential Resonante Energy Transfer*) basada en las técnicas de BRET y FRET (Carriba *et al.* 2008) y la técnica de BRET y complementación bimolecular (Vidi y Watts 2009) que permiten la detección de heterómeros de más de dos receptores.

Existen técnicas directas para detectar oligómeros en tejidos nativos. Una de ellas utiliza la microscopia de fuerza atómica. Palczewski y colaboradores (Fotiadis *et al.* 2003) usando microscopia de fuerza atómica demostraron, por primera vez, oligómeros de rodopsina en la retina con un determinado patrón de distribución. Esta técnica es factible cuando la concentración de receptores en el tejido es muy elevada como ocurre con la rodopsina en la retina, pero es de difícil aplicación para la mayoría de receptores del sistema nervioso central cuya expresión es moderada.

La técnica de la *In Situ Proximity Ligation Assay* (PLA) es una técnica directa muy útil si se dispone de anticuerpos específicos para los receptores que heteromerizan (Gustafsdottir *et al.* 2005; Soderberg *et al.* 2006; Thymiakou *et al.* 2007; Soderberg *et al.* 2008; Yu *et al.* 2008; Massinen *et al.* 2009; Miyazono *et al.* 2009; Baan *et al.* 2010; Vuoriluoto *et al.* 2010; Weibrecht *et al.* 2010; Hervouet *et al.* 2011; Renfrow *et al.* 2011). Esta tecnología amplía las capacidades de los inmunoensayos tradicionales al incluir la detección directa de proteínas, interacciones entre proteínas y modificaciones de estas interacciones con alta sensibilidad y especificidad. La técnica de la PLA está basada en el reconocimiento y marcaje de una o dos proteínas que actúan como antígenos (por ejemplo dos receptores que están interaccionando), por parte de dos anticuerpos primarios conjugados a unos oligonucleótidos complementarios. Cuando las dos moléculas de anticuerpo están muy cercanas (< 16 nm), se produce la ligación entre las cadenas de DNA complementarias. Posteriormente, las cadenas de DNA se amplifican en presencia de nucleótidos fluorescentes, emitiendo una señal positiva en forma de punteado fluorescente observable al microscopio confocal. Como la fluorescencia puede ser cuantificada, la señal PLA proporciona no solo la información

espacial exacta (la localización de los eventos de interacción), sino también una manera objetiva de cuantificar estos eventos (Gustafsdottir *et al.* 2005; Soderberg *et al.* 2008).

La técnica es igualmente aplicable utilizando un anticuerpo específico no marcado y anticuerpos secundarios unidos a ADN (Figura 13).

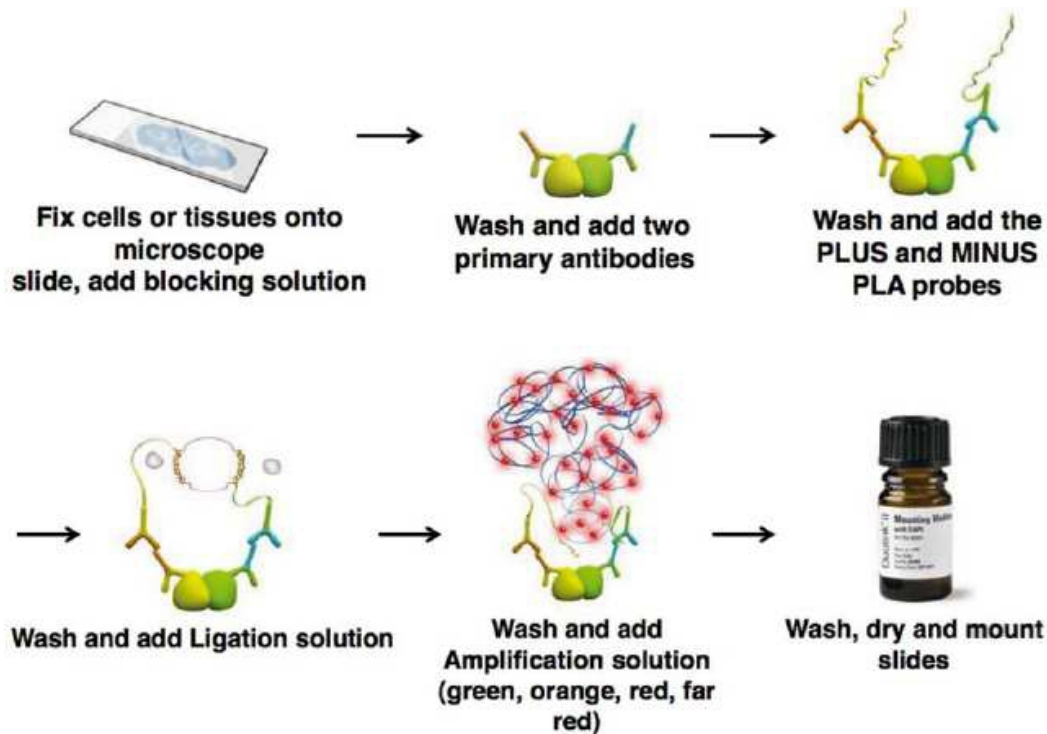


Figura 13. Representación de la técnica *In situ Proximity Ligation Assay*. (Extraído de Olink Bioscience)

La utilización de ligandos para heterómeros constituye otra técnica directa para su detección. Se pueden seguir varias estrategias dependiendo de las propiedades del heterodímero (Rozenfeld *et al.* 2006). Uno de los enfoques consiste en el diseño y síntesis de ligando bivalentes que interaccionen con los dos receptores del heterodímero. Estos ligando pueden tener mayor afinidad y selectividad si se compara con los ligando clásicos de los receptores individuales. Esta estrategia se ha utilizado para determinar la presencia de heterómeros de receptores de adenosina A_{2A} y de dopamina D_2 en el estriado de cerebro de cordero (Soriano *et al.* 2009). Otra aproximación sería utilizar ligandos selectivos de un determinado heterodímero. Estos ligando interaccionan con el centro de unión de un receptor únicamente cuando forma parte del heterodímero (Waldhoer *et al.* 2005; Orru *et al.* 2011) (Tabla 3).

Existen técnicas indirectas para detectar oligómeros en tejidos nativos. Una manera bastante eficaz de detectar oligómeros en tejidos nativos es determinar alguna característica específica de los heterómeros en células donde se haya demostrado la heteromerización y utilizar esta propiedad como huella dactilar o *fingerprint* para detectar el heterómero en tejidos nativos. La determinación de *cross-talk* entre cascadas de señalización intracelular, el antagonismo cruzado en el que un antagonista específico de un receptor inhibe la señalización mediada por un agonista del otro receptor, o bien, el estudio de cambios en la unión de ligando en uno de los receptores en presencia de un ligando para el otro receptor en preparaciones de membranas obtenidas de tejidos, pueden constituir una huella dactilar si se ha demostrado previamente que es una característica del heterómero.

| | Ventajas | Inconvenientes |
|--|--|---|
| Ligandos Bivalentes | Alta selectividad. Pocos efectos secundarios. Diseño racional del compuesto. | Alto peso molecular de los compuestos. No poseer las propiedades fisicoquímicas de un fármaco (i.e. no satisfacer las reglas de Lipinski; (Lipinski, et al., 2001)). |
| Ligandos selectivos de heterodímero | Alta selectividad. Pocos efectos secundarios. Bajo peso molecular de los compuestos. Pueden satisfacer las reglas de Lipinski (Lipinski, et al., 2001). | Se basa en el supuesto de que la heterodimerización altera drásticamente el sitio de unión. Difícil diseño racional de los compuestos. Necesita una extensa exploración para la identificación del ligando. |

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de ligando usados para detectar la oligomerización de los GPCR. (Extraído de Rozenfeld *et al.* 2006)

1.2.4 El modelo de receptores diméricos o *Two-State Dimer Receptor Model*

Durante muchos años el análisis de los estudios de unión de diferentes ligandos a GPCRs, se ha llevado a cabo utilizando diversos modelos matemáticos en los que estos receptores eran considerados como entidades proteicas monoméricas (Del Castillo y Katz 1957; De Lean *et al.* 1980; Samama *et al.* 1993; Leff 1995; Weiss *et al.* 1996). Así por ejemplo, cuando el ajuste de datos experimentales de unión de ligando genera diagramas de Scatchard lineales los datos se ajustan a un modelo de un centro de unión que permite calcular la K_D (constante de afinidad) del único estado de afinidad del receptor. Sin embargo, la unión de agonistas a receptores de siete dominios

transmembrana a menudo genera diagramas de Scatchard no lineales y, en estos casos, los resultados se ajustan tradicionalmente, al modelo de “dos centros independientes” que considera la existencia de dos estados independientes del receptor (estados no interconvertibles): un estado de alta afinidad (o acoplado a proteína G) y un estado de baja afinidad (o desacoplado a proteína G). El ajuste de los datos a este modelo permite el cálculo de dos K_D : una para el estado de alta afinidad (K_{DH}) y otra para el estado de baja afinidad (K_{DL}). Sin embargo, se ha observado que el agonista induce cambios en la proporción de los llamados estados de “alta” y “baja” afinidad, lo cual indica que estos dos estados no pueden existir separadamente, sino que están interconectados (Wong *et al.* 1986) y esta aparente interconversión entre estados es independiente de la proteína G (Casadó *et al.* 1991). Además, trabajando con receptores de adenosina A_1 , se demostró que un agonista total puede provocar un cambio aparente en la proporción de receptores en estado de alta y baja afinidad (Casadó *et al.* 1991). Si el agonista es capaz de variar la proporción de los estados de alta y baja afinidad, estas dos formas deben estar en equilibrio y, consecuentemente, el modelo de dos centros independientes no puede representar adecuadamente el comportamiento de los receptores si los estados de afinidad están en equilibrio.

Puesto que actualmente se conoce que los GPCR forman dímeros (Bouvier 2001; Devi 2001; Gomes *et al.* 2001; Rios *et al.* 2001; Agnati *et al.* 2003; Franco *et al.* 2003; Terrillon y Bouvier 2004; Agnati *et al.* 2005; Franco *et al.* 2005; Prinster *et al.* 2005; Milligan 2006, Milligan 2007), las isotermas de unión bifásicas (representaciones de Scatchard no lineales) y las curvas de competición bifásicas pueden interpretarse de una manera más directa y evidente ya que pueden explicarse como un fenómeno de cooperatividad. La cooperatividad positiva o negativa puede explicarse de manera natural asumiendo que la unión de la primera molécula de ligando a uno de los monómeros del dímero modifica los parámetros de unión de la segunda molécula de ligando al otro monómero del dímero, como ocurre en el caso de las enzimas. Recientemente, se han desarrollado modelos que consideran al dímero como la unidad básica (Durroux 2005; Franco *et al.* 2005; Albizu *et al.* 2006; Franco *et al.* 2006). El grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis ha formulado el “*Two-State Dimer Receptor Model*” (“modelo de receptores diméricos”), que considera el homodímero como la unidad básica funcional (Franco *et al.* 2005; Franco *et al.* 2006) (Figura 14).

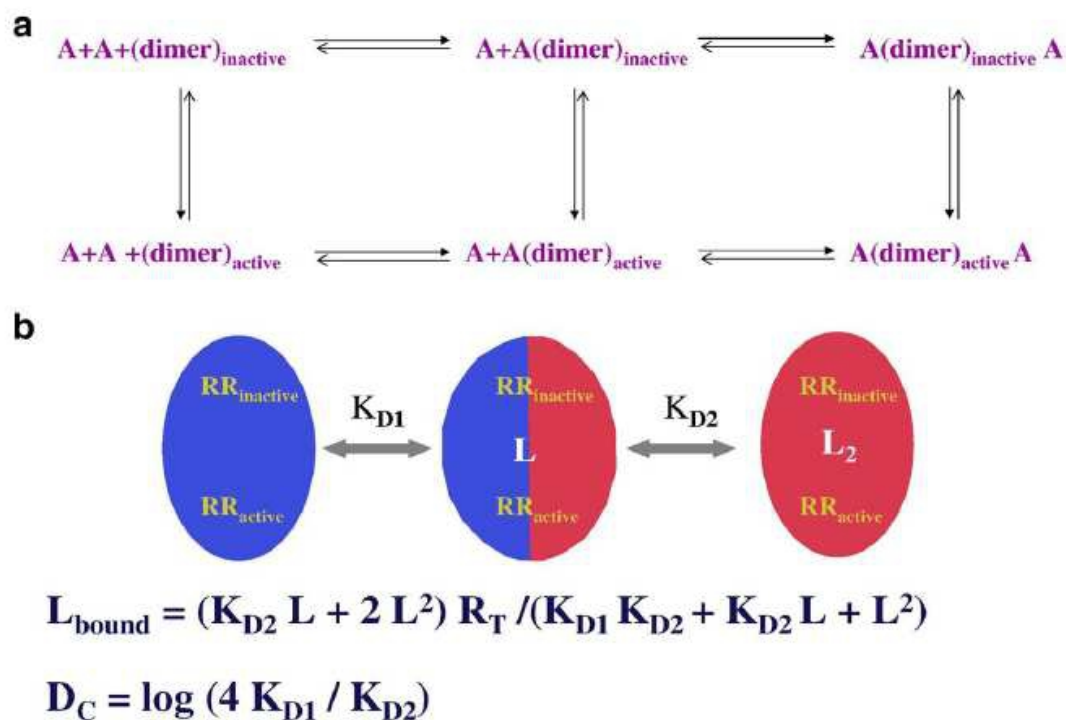


Figura 14. Esquema y ecuaciones del “modelo de receptores dimérico” (“Two-State Dimer Receptor Model”). El dimerio puede ser inactivo o activo y puede estar vacío u ocupado por una o dos moléculas de ligando. a) Modelo macroscópico b) Modelo simplificado que incluye las constantes de disociación macroscópicas en el equilibrio, (K_{D1} y K_{D2}) que definen la unión de la primera y segunda molécula de ligando al dimerio. Se muestran las ecuaciones para el ajuste de los valores de unión del radioligando (L) a los receptores que forman el dimerio y para calcular el índice de cooperatividad del dimerio (D_C). Ver (Franco *et al.* 2005; Franco *et al.* 2006; Casado *et al.* 2007) para más detalles (extraído de Franco *et al.* 2008b)

Este modelo considera que el cambio conformacional inducido por un ligando desde uno de los componentes del dimerio es transmitido al otro componente del dimerio a través de un fenómeno de cooperatividad y permite calcular un parámetro que mide el grado de cooperatividad (D_C). Este modelo es una extensión del modelo de “dos estados de activación de un receptor”, pero considera que las estructuras diméricas son capaces de unir una molécula en el centro ortostérico de cada monómero. Asumiendo la isomerización del receptor entre las especies inactiva (RR) y activa (RR*), el modelo es capaz de explicar el comportamiento de los receptores de siete dominios transmembrana para los cuales muchas veces la representación de Scatchard no es lineal (Franco *et al.* 2005; Franco *et al.* 2006).

Nuestro grupo de investigación ha profundizado en el desarrollo del “modelo de receptores diméricos” y ha formulado ecuaciones para la unión de radioligando que

tienen en cuenta las constantes macroscópicas y que permiten ajustar los datos de experimentos de saturación y de experimentos de competición. Estas ecuaciones permiten el cálculo de las constantes de disociación macroscópicas correspondientes a la unión de la primera molécula de ligando al dímero no ocupado (K_{D1}) y a la unión de la segunda molécula de ligando al dímero semiocupado (K_{D2}). A su vez, las ecuaciones permiten el cálculo del índice de cooperatividad (D_c) que mide el grado de cooperatividad que se produce entre la primera entrada de ligando al receptor vacío y la segunda entrada de ligando al receptor en el dímero semiocupado; es decir, es un parámetro que detecta los cambios estructurales que ocurren en una molécula de receptor en el dímero cuando el ligando se une al otro receptor en el dímero (Casadó *et al.* 2007, 2009a, 2009b).

La posibilidad de calcular las constantes de disociación de la unión de la primera molécula de ligando (K_{D1}) y la segunda molécula de ligando (K_{D2}) al homodímeros y el índice de cooperatividad (D_c) permite una cuantificación sencilla de los efectos de los reguladores alostéricos. Estos reguladores alostéricos son moléculas naturales o sintéticas que interaccionan con un centro alostéricos del receptor y alteran la unión del ligando al centro ortostérico y por consiguiente regulan la activación del receptor. En el “modelo de receptores diméricos”, o *two state dimer receptor model*, la proteína G heterotrimérica se considera un modulador alostérico del dímero ya que se une a un centro de unión no ortostérico y puede modificar las características de unión de los centros ortostéricos en el dímero (Hepler y Gilman 1992). El “modelo de receptores diméricos” considera que un modulador alostéricos puede ser cualquier molécula que se una a un centro no ortostérico, u otra proteína que interacciona con el receptor y afecta sus características de unión. Puede afectar tanto a las constantes de disociación como al índice de cooperatividad.

1.3 LA ADENOSINA Y SUS RECEPTORES

La adenosina es un nucleósido de purina formado a partir de la unión de la adenina con un anillo de ribosa a través de un enlace glucosídico β -N₉. Es una purina endógena que se sintetiza como consecuencia de la degradación de nucleótidos tales como el ATP, el ADP y el AMP. Juega un papel muy importante en cada uno de los órganos de todos los sistemas vivos y su función, al igual que su presencia, es amplia y variada. Está involucrada en las funciones del sistema nervioso central, sistema reproductivo, cardíaco, renal, hepático y respiratorio (Dunwiddie y Masino 2001; Okusa 2002; Hove-Madsen *et al.* 2006; Spicuzza *et al.* 2006; Schuh *et al.* 2007). Además, forma parte de moléculas más complejas implicadas en los procesos energéticos de la célula y en el almacenamiento de la información genética del ADN.

1.3.1 Funciones en el sistema nervioso central

Las funciones bioquímicas de la adenosina, por sí sola o formando parte de moléculas más complejas, pueden dividirse en cuatro grandes grupos:

- 1- Arquitectura de los ácidos nucleicos.
- 2- Procesos energéticos (en sus formas fosforiladas).
- 3- Funciones intracelulares (AMPc, cofactor de enzimas (NAD⁺, NADP⁺, FAD, ATP)).
- 4- Moduladora de funciones biológicas (señalización extracelular).

En el sistema nervioso central la adenosina es un importante neuromodulador que está implicado en una gran variedad de actividades cerebrales. Es secretada por la mayoría de células del sistema nervioso central, incluyendo neuronas y células gliales, y modula la actividad nerviosa actuando a nivel presináptico, postsináptico y/o extrasináptico.

La adenosina está presente constitutivamente en concentraciones muy bajas <1 μ M, pero en situaciones de estrés metabólico su concentración aumenta de forma considerable. Así, los niveles de adenosina en el plasma pueden llegar a concentraciones de hasta 4-10 μ M en pacientes con shock séptico (Martin *et al.* 2000). Se puede considerar a la adenosina como un modulador de la actividad nerviosa, que con pequeños efectos sincroniza las actividades neuronales, controlando la transmisión y la

plasticidad sináptica (Ribeiro *et al.* 2002). La adenosina además de ser un modulador por sí solo, es capaz de contribuir a un control más estricto sobre otros moduladores y/o neurotransmisores.

Esta capacidad de influenciar el efecto de otras moléculas señalizadoras que actúan sobre sus receptores específicos, es debido a que la adenosina es secretada por casi todas las células y se encuentra entre las moléculas más relevantes en la comunicación, tanto en neuronas como en células gliales (Sebastiao y Ribeiro 2009). La adenosina una vez liberada participa en procesos normales y patofisiológicos (Figura 15), como la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Phillis *et al.* 1979; Ciruela *et al.* 2006), la inhibición de la actividad motora espontánea, la diferenciación y migración neuronal (Rivkees 1995; Svenningsson *et al.* 1999; Canals *et al.* 2005), el conocimiento y la memoria (Fredholm *et al.* 2000; Fontinha *et al.* 2009), la regulación de la función respiratoria y en particular en aquellos procesos relacionados con el sueño (Antle *et al.* 2001; Bjorness *et al.* 2009; Longordo *et al.* 2009), la ansiedad (Johansson *et al.* 2001) y la excitación, además de la neuroprotección en episodios de hipoxia/isquemia (Moreau y Huber 1999; Burnstock 2009). También se ha relacionado con la enfermedad de Alzheimer (Maia y de Mendonca 2002), la enfermedad de Parkinson (Schwarzschild *et al.* 2002; Popoli 2008a; Jenner *et al.* 2009), la enfermedad de Huntington (Reggio *et al.* 1999; Popoli *et al.* 2008b), la esquizofrenia (Ferré 1997; Wardas 2008), la epilepsia (Dunwiddie y Masino 2001; Ribeiro *et al.* 2003), la adicción a las drogas (Maldonado *et al.* 1996; Manzoni *et al.* 1998; Knapp *et al.* 2001; Brown y Short 2008) y la plasticidad sináptica (Ribeiro *et al.* 2002).

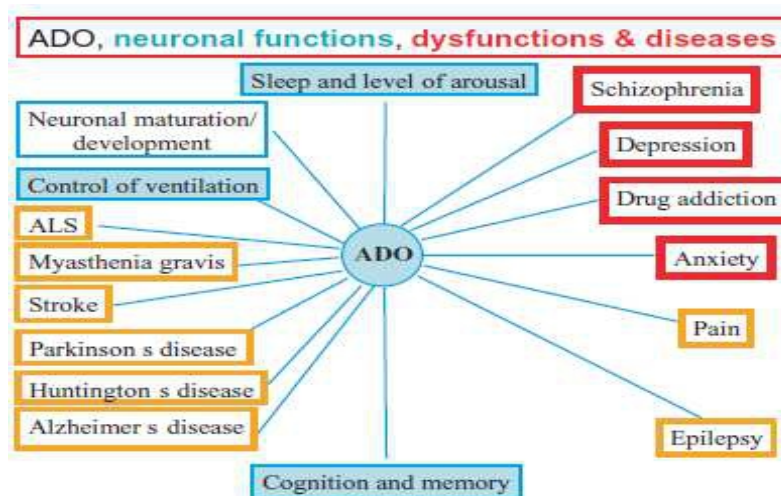


Figura 15. Funciones descritas para la adenosina en el sistema nervioso central. Azul, algunas funciones cerebrales. Rojo y amarillo, disfunciones y patologías (extraído de Ribeiro y Sebastiao 2010)

1.3.2 Receptores de adenosina

La adenosina lleva a cabo sus funciones a través de la interacción con diferentes receptores de membrana acoplados a proteína G. Estos receptores se han clasificado en base a sus propiedades moleculares, bioquímicas y farmacológicas en 4 subtipos: los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Ribeiro *et al.* 2002) (Figura 16). La adenosina, mayoritariamente, lleva a cabo la neuromodulación a través de la activación de sus receptores de alta afinidad: A_1 y A_{2A} . Los receptores de adenosina A_{2B} y A_3 son de baja afinidad por lo que su activación puede ser relevante en condiciones en las que la concentración de adenosina se vea incrementada de forma notoria.

Los receptores de adenosina participan en distintos procesos como el sueño, la vigilia, el aprendizaje, la memoria, el daño neuronal, la neurodegeneración y la maduración neuronal. Estas funciones pueden tener implicaciones en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson, en la epilepsia, en episodios de hipoxia/isquemia e incluso en la adicción a drogas, donde el control del grado de activación de los receptores de adenosina puede tener muchas aplicaciones terapéuticas (Ribeiro *et al.* 2002).

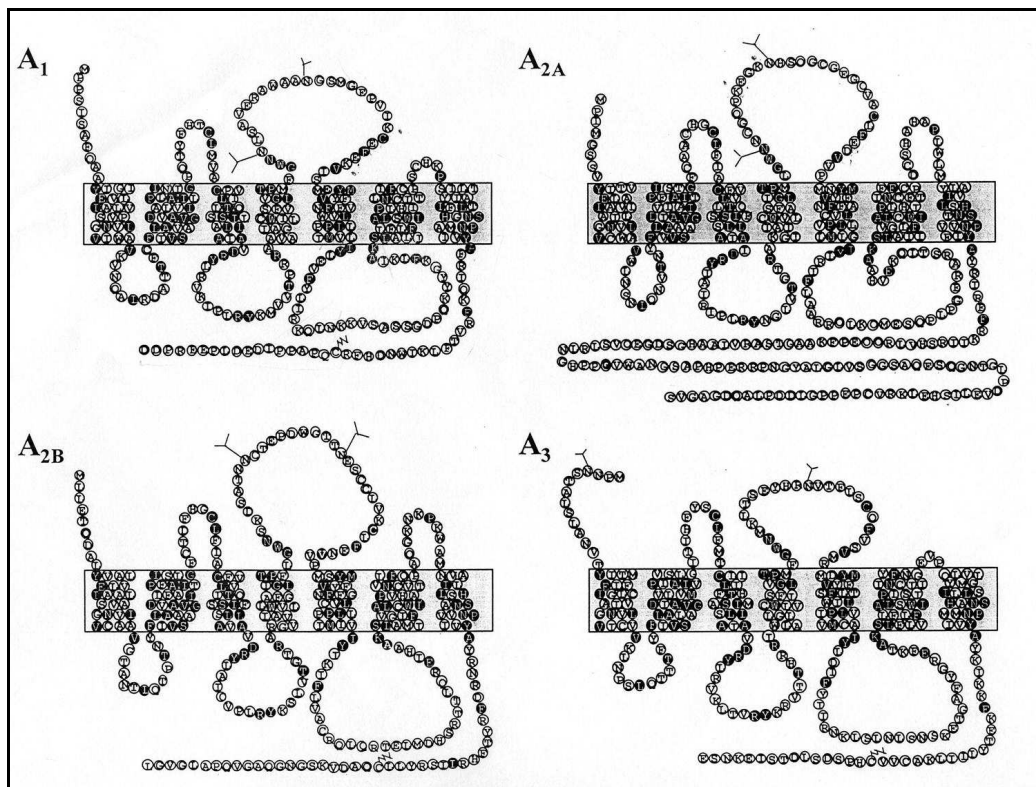


Figura 16. Estructura de los receptores de adenosina humanos

El grado de homología entre los receptores de adenosina es bajo, del orden del 45% (Pierce *et al.* 1992; Stehle *et al.* 1992), siendo destacable la larga cola carboxi terminal que presenta el receptor A_{2A}. Al igual que para otros GPCR, la mayor homología se presenta en las regiones transmembrana, que se cree están próximas entre sí formando el centro de unión del ligando conjuntamente con la zona hipervariable correspondiente a la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular (Fredholm *et al.* 1994; Rivkees *et al.* 1999).

La interacción con la proteína G tiene lugar, básicamente, en el tercer bucle intracelular (IC3) y en el extremo C-terminal. Cabe destacar que todos presentan secuencias consenso de fosforilación en los dominios intracelulares y que esta fosforilación está implicada en el mecanismo de desensibilización de los receptores (Ramkumar *et al.* 1991; Palmer *et al.* 1994; Saura *et al.* 1998). Todos los receptores de adenosina exhiben secuencias consenso de N-glicosilación en el segundo bucle extracelular (EC2), que se cree que están implicadas en el tránsito del receptor a la membrana (Klotz y Lohse 1986; Stiles 1986).

Dado que la adenosina participa en una gran variedad de funciones del SNC, es fácil suponer que los diversos subtipos de receptores estarán acoplados a diferentes señales intracelulares. Así, el receptor A₁ que se acopla a proteínas G_{i/o} (Freissmuth *et al.* 1991; Munshi *et al.* 1991; Kiesman *et al.* 2009) provoca la inhibición de la adenilato ciclasa (AC) (Londos *et al.* 1980) y la activación de la fosfolipasa C (PLC) con el consiguiente incremento en los niveles de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) en el interior celular (Gerwins y Fredholm 1992), lo que incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular. También provoca la activación de varios tipos de canales de K⁺, probablemente vía las subunidades Gβγ (Trussell y Jackson 1985) e inhibe los canales de calcio (MacDonald *et al.* 1986). El receptor A₃ también inhibe a la AC mediante el acoplamiento a la proteína G_i (Zhou *et al.* 1992), aunque también puede acoplarse a la proteína G_q (Palmer *et al.* 1995) activando la PLC e incrementando los niveles intracelulares de Ca²⁺ (Abbracchio *et al.* 1995). La principal vía de señalización de los receptores A_{2A} y A_{2B} es la estimulación de la formación de AMPc a través de la proteína G_s (Jenner *et al.* 2009), lo que a su vez estimula a la proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA, regulando el estado de fosforilación de varios sustratos intracelulares. Sin embargo, el receptor A_{2A} puede acoplarse también a proteínas G_{olf} (Kull *et al.*

2000), y el receptor A_{2B} a proteínas G_q mediante la activación de la PLC y la movilización de Ca²⁺ intracelular dependiente de DAG e IP₃ (Feoktistov y Biaggioni 1995) (Tabla 4).

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

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

Tabla 4. Receptores de adenosina. Clasificación y funciones en el sistema nervioso central.

Aunque la adenosina es el agonista endógeno, no es una buena herramienta para el estudio de estos receptores debido a su alta susceptibilidad para ser metabolizada por varios enzimas. Sin embargo, la adenosina es la base estructural de todos los agonistas

conocidos. Existen tres posiciones en la molécula sensibles a ser modificadas para incrementar la afinidad para cada subtipo específico de receptor sin anular la actividad como agonista: la posición 5' de la ribosa y las posiciones 2 y 6 del anillo de la adenina (Baraldi *et al.* 2006; Choi *et al.* 2009) (Figura 17).

Las metilxantinas, como la cafeína y la teofilina, constituyen el prototipo de antagonista de estos receptores. Las modificaciones sobre esta molécula dan lugar a una numerosa familia de derivados de xantina muchos de los cuales presentan selectividad por los distintos subtipos.

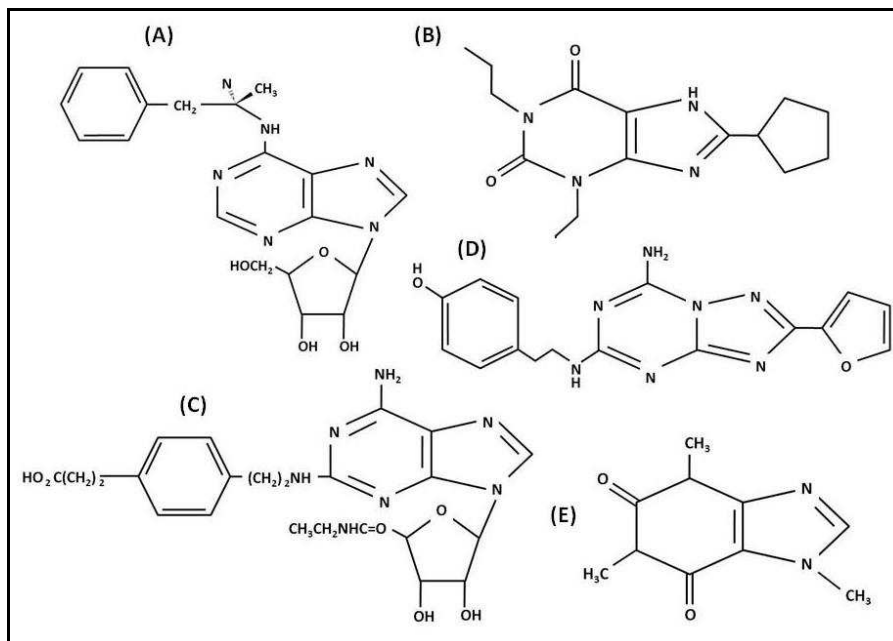


Figura 17. Agonistas y antagonistas de los receptores A1 y A2A de adenosina. A) RPIA, agonista de A₁R. B) DPCPX, antagonista de A₁R. C) CGS21680, agonista de A_{2A}R. D) ZM241385, antagonista de A_{2A}R. E) Cafeína, antagonista de A₁R y de A_{2A}R.

1.4 LA ADENOSINA DESAMINASA (ADA)

La adenosina desaminasa (ADA; EC.3.5.4.4) es un enzima clave en la ruta de las purinas que cataliza la desaminación irreversible de la adenosina o la 2'-desoxiadenosina a inosina o 2'-desoxiinosina, respectivamente y amonio (Conway y Cooke 1939; Cristalli *et al.* 2001). El incremento de la velocidad de hidrólisis de la adenosina en la presencia de ADA es de, aproximadamente $2 \cdot 10^{12}$, lo que lo sitúa entre los enzimas más eficientes descritos hasta el momento (Frick *et al.* 1986). La ADA está presente en todos los tejidos de mamífero, si bien los mayores niveles se encuentran en los nódulos linfáticos, el bazo y el timo (Van der Weyden y Kelley 1976; Chechik *et al.* 1981).

En humanos, este enzima está codificado por un gen de 32 kb, presente en el cromosoma 20q (Petersen *et al.* 1987) y se encuentra en todos los tejidos en forma de un enzima monomérico de 363 aminoácidos, con un peso molecular de 41 kDa. De todas las secuencias aminoácidas conocidas de ADA, la correspondiente al enzima bovino es la más semejante a la ADA humana (91% de homología) (Daddona *et al.* 1984; Kelly *et al.* 1996). Entre las secuencias del enzima bovino y del de ratón hay un 85% de homología, mientras que la que existe entre la ADA humana y la de ratón es del 83% (Yeung *et al.* 1985). En la Figura 18 se muestran las secuencias aminoácidas de la ADA humana, de la bovina y de la de ratón.

1.4.1 Características estructurales

En la década de los años 90, se determinaron las estructuras tridimensionales de diferentes complejos binarios cristalizados de la ADA murina con distintos análogos estructurales del sustrato natural adenosina, mediante la técnica de difracción de rayos X. Los complejos binarios obtenidos fueron: el de la deazaadenosina (ADA-DAA), un análogo del estado basal (Wilson y Quioco 1993), el de la 8(R)-hidroxi-2'-desoxicoformicina (pentostatina) (ADA-DCF), un análogo del estado de transición (Wang y Quioco 1998) y el del 6(S)-hidroxi-1,6-dihidropurín ribósido (ADA-HDPR), un análogo casi ideal del estado de transición (Wilson *et al.* 1991; Wang y Quioco 1998).

| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|------------------------------------|-------|---------------|--------------|-------------|---------------|-----------------|
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (1) | MAQTPAFD | KPKVELHVHLDG | SIKPETILY | YGRRRGIALPANT | AEGLLNVI |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (1) | MAQTPAFN | KPKVELHVHLDG | AIKPETILY | YGRKRGIALPADT | PEELQNTII |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (1) | MAQTPAFN | KPKVELHVHLDG | AIKPETILY | YGRKRGIALPADT | VEELRNII |
| Consensus | (1) | MAQTPAFN | KPKVELHVHLDG | AIKPETILY | YGRKRGIALPADT | EELNII |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (51) | GMDKPLSL | PLPFLAKFDY | YMPA | IAGCREA | IKRIAYEFVEMKAKE |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (51) | GMDKPLSL | PLPFLAKFDY | YMPA | IAGCREA | IKRIAYEFVEMKAKE |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (51) | GMDKPLSL | PLPFLAKFDY | YMPV | IAGCREA | IKRIAYEFVEMKAKE |
| Consensus | (51) | GMDKPLSL | PLPFLAKFDY | YMPA | IAGCREA | IKRIAYEFVEMKAKE |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (101) | RYSPELLANSKVE | EIPWNQAE | EGDLTPDE | VVALV | CGQLQEGE |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (101) | RYSPELLANSKVE | EIPWNQAE | EGDLTPDE | VVALV | CGQLQEGE |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (101) | RYSPELLANSKVD | EMPWNQTE | EGDVTPDD | VVDLVN | CGQLQEGE |
| Consensus | (101) | RYSPELLANSKVE | EIPWNQAE | EGDLTPDE | VVALV | CGQLQEGE |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (151) | ILCCMRHQPN | WSPKVVELCKKY | QQT | TVVAID | LAGDETI |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (151) | ILCCMRHQPS | WSSEVVELCKKY | REQT | TVVAID | LAGDETI |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (151) | ILCCMRHQPS | WSLEVI | ELCKKYNQ | RTVVAID | LAGDETI |
| Consensus | (151) | ILCCMRHQPS | WSSEVVELCKKY | QQT | TVVAID | LAGDETI |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (201) | YEA | AVKSGI | HRTVHAGEVGS | AEVVK | EAVIDILKTER |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (201) | YEA | AVKSGV | HRTVHAGEVGS | ANVVK | EAVIDTLKTER |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (201) | YEA | AVKNGI | HRTVHAGEVGS | PEVVK | EAVIDILKTER |
| Consensus | (201) | Y | EAVKSGI | HRTVHAGEVGS | AEVVK | EAVIDILKTER |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (251) | RLRQENMHFE | ICPWSSYLTGAW | KPDTE | HAVITL | LKNDQ |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (251) | RLRQENMHFE | ICPWSSYLTGAW | KPDTE | HAVVRE | FKNDQ |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (251) | RLRQENMHFE | ICPWSSYLTGAW | KPDTE | HAVVRE | FKNDQ |
| Consensus | (251) | RLRQENMHFE | ICPWSSYLTGAW | KPDTE | HAVVRE | FKNDQ |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (301) | KSTLDD | TDYQMTK | NDMGFT | EEEFKRLN | INAAKSSFL |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (301) | KSTLDD | TDYQMTK | NDMGFT | EEEFKRLN | INAAKSSFL |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (301) | KSTLDD | TDYQMTK | NDMGFT | EEEFKRLN | INAAKSSFL |
| Consensus | (301) | KSTLDD | TDYQMTK | NDMGFT | EEEFKRLN | INAAKSSFL |
| Adenosine deaminase (Homo sapiens) | (351) | YGMP | ASAG | QNL | | |
| Adenosine deaminase (Bos taurus) | (351) | YGMP | ASAE | QCL | | |
| Adenosine deaminase (Mus musculus) | (351) | YQ | ----- | | | |
| Consensus | (351) | YGMP | ASA | Q | L | |

Figura 18. Alineamiento de las secuencias de ADA humana, bovina y de ratón. Los residuos idénticos se representan en rojo con fondo amarillo; los cambios conservativos se representan en azul con fondo gris; los residuos similares se representan en negro con fondo verde y los cambios no conservativos se representan en negro con fondo blanco. El alineamiento ha sido generado con el programa Vector NTI 9.0.0 ©1994-2003 InfoMax

En la Figura 19 se muestra la estructura de la ADA unida al análogo estructural HDPR. En todos los complejos binarios mencionados se puso de manifiesto que el enzima tenía una estructura de barril β con ocho hélices α y ocho láminas β , ((β/α)₈). El centro activo se halla situado en una cavidad muy profunda localizada en el extremocarboxi terminal del barril β , en cuando interior se encuentra un ion Zn^{2+} fuertemente unido al enzima y que es esencial para su actividad catalítica. La geometría de coordinación del ión Zinc (Zn^{2+}) en el centro activo es la de una bipirámide trigonal. Dicho ión está coordinado con: a) tres átomos de nitrógeno ($N_{\epsilon 2}$ s) del anillo de imidazol de las cadenas laterales de los aminoácidos His15, His17 e His214; b) con el átomo de oxígeno ($O_{\delta 2}$) del grupo carboxilato del aminoácido Asp295 y c) con el grupo hidroxilo de los ligando (el 6-OH en el HDPR, el 8-OH en la DCF o el del agua en la DAA) (Wang y Quioco 1998).

En el caso del complejo ADA-HDPR, aunque la ADA murina fue cristalizada y obtenida en presencia de ribósido de purina (PR), un análogo del estado basal, el ligando que se detectó en el centro activo fue el HDPR. Este resultado demostró que

este compuesto podía sintetizarse enzimáticamente por adición estereoespecífica del grupo hidroxilo de una molécula de agua catalítica, activada por el ión Zn^{2+} , al átomo de carbono C6 del anillo del purín ribósido (Wilson *et al.* 1991; Wang y Quioco 1998). Años más tarde, Kinoshita *et al.* (2003) obtuvieron el mismo complejo binario cristalizado (ADA-HDPR) a partir de ADA bovina y de PR. Se confirma, por tanto, que el enzima cataliza la hidratación del PR durante el proceso de cristalización transformándolo en HDPR.

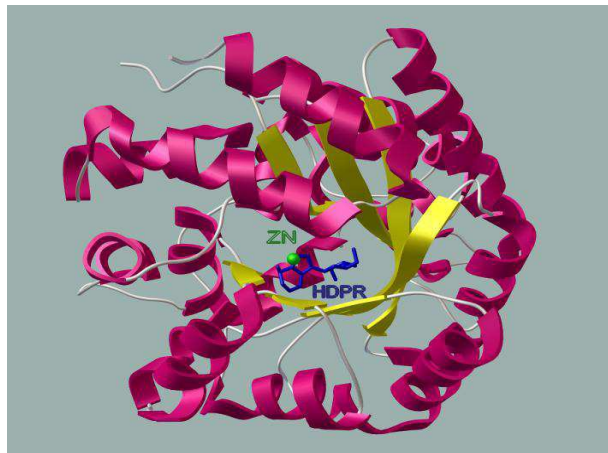


Figura 19. Estructura cristalográfica del complejo binario de la adenosina desaminasa bovina y el HDPR: 6(S)-hidroxi-1,6-dihidropurín ribósido, ZN: ión Zn^{2+} . DOI: 10.2210/pdb1krm/pdb (imagen generada con el programa Python Molecular Viewer Versión.1.5.4)

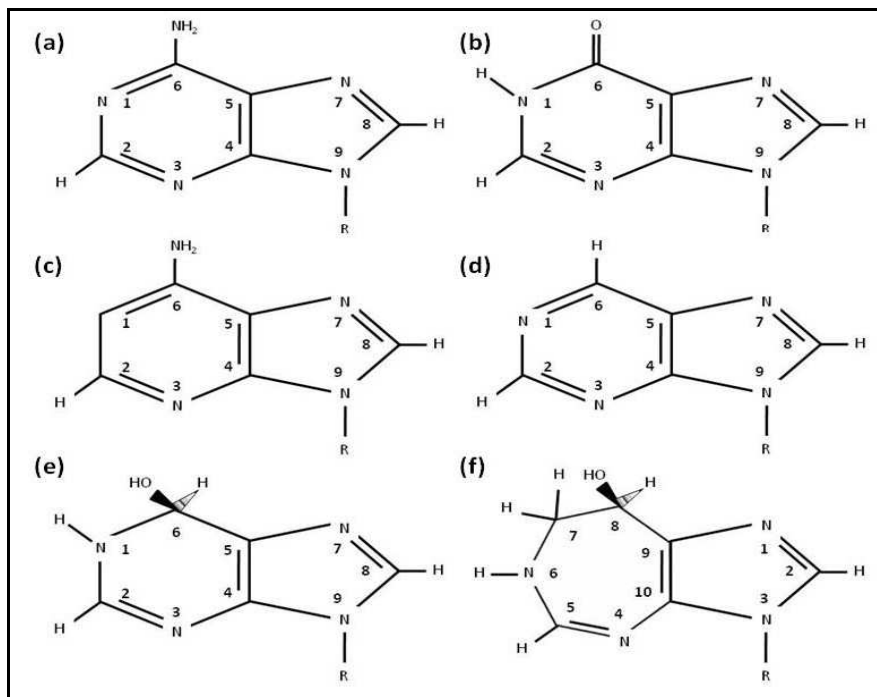


Figura 20. Análogos estructurales de la adenosina. a) Adenosina, b) inosina, c) 1-deazaadenosina, d) ribósido de purina, e) 6S-hidroxi-1,6-dihidropurín ribonucleósido, f) desoxicoformicina. R, ribosa unida a la adenosina y a sus análogos (extraído y modificado de Kinoshita *et al.* 2003)

En la Figura 20 se muestran las estructuras de la adenosina, de la inosina y de los análogos estructurales anteriormente mencionados, mientras que en la Figura 21 se esquematizan las interacciones entre los distintos grupos funcionales del HDPR y diferentes aminoácidos del centro activo de la ADA (Kinoshita *et al.* 2003).

Es un hecho conocido que muchas proteínas experimentan cambios conformacionales al interactuar con sus sustratos, con diferentes ligando o con otras macromoléculas. En el caso de la ADA se ha observado que este enzima tiene dos conformaciones distintas denominadas forma abierta y forma cerrada (Wilson *et al.* 1991; Wilson y Quioco 1993; Wang y Quioco 1998; Kinoshita *et al.* 2005).

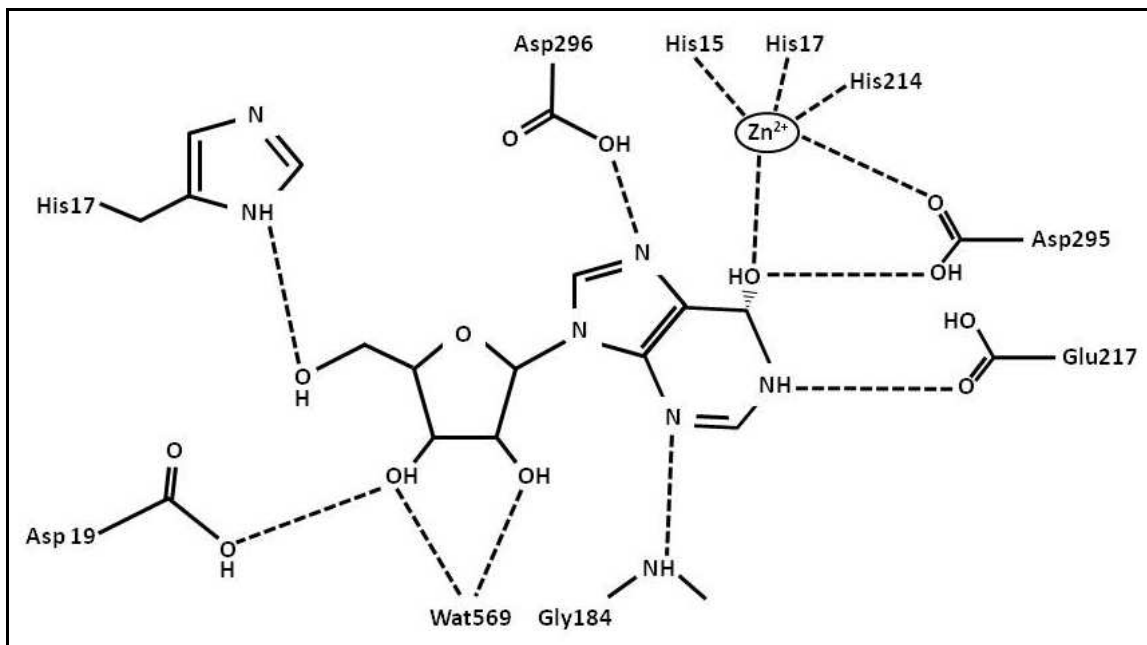


Figura 21. Interacciones no hidrofóbicas entre la adenosina desaminasa (ADA) y el análogo del estado de transición HDPR. Las líneas discontinuas representan enlaces de hidrógeno y de coordinación. El HDPR interactúa con la ADA a través de 6 enlaces de hidrógeno y un enlace coordinado con el ión Zinc. También se muestra la molécula de agua que interactúa con el HDPR a través de dos enlaces de hidrógeno (extraído y modificado de Kinoshita *et al.* 2003)

En ausencia de ligandos, la entrada del centro activo, que consiste en una hélice α (Thr57-Ala73) y el esqueleto peptídico de una hebra β (Leu182-Asp185), está en la forma abierta. En presencia de sustrato o de ciertos inhibidores se produce un cambio conformacional y el centro activo se encuentra en la forma cerrada (Wilson *et al.* 1991; Wang y Quioco 1998; Kinoshita *et al.* 2003; Terasaka *et al.* 2004; Kinoshita *et al.* 2005; Kinoshita *et al.* 2008) (véase Figura 22). Kinoshita y colaboradores, (Kinoshita *et al.* 2005) han hipotetizado que la eliminación de una molécula de agua específica,

conocida como “*trigger water*”, situada en el fondo del centro activo, podría tener una función importante como interruptor conformacional desde la forma abierta a la forma cerrada. Un cambio estructural similar pero mucho más drástico, asociado a la unión del sustrato o de inhibidores, ha sido detectado recientemente en el enzima del parásito de la malaria humana *Plasmodium vivax* (Larson *et al.* 2008). Para la ADA de esta procedencia, la adenosina se halla prácticamente aislada del entorno en la forma cerrada, a diferencia del enzima de mamíferos, en el que el sustrato todavía se encuentra, aunque en pequeña medida, accesible al solvente cuando está unido a la ADA.

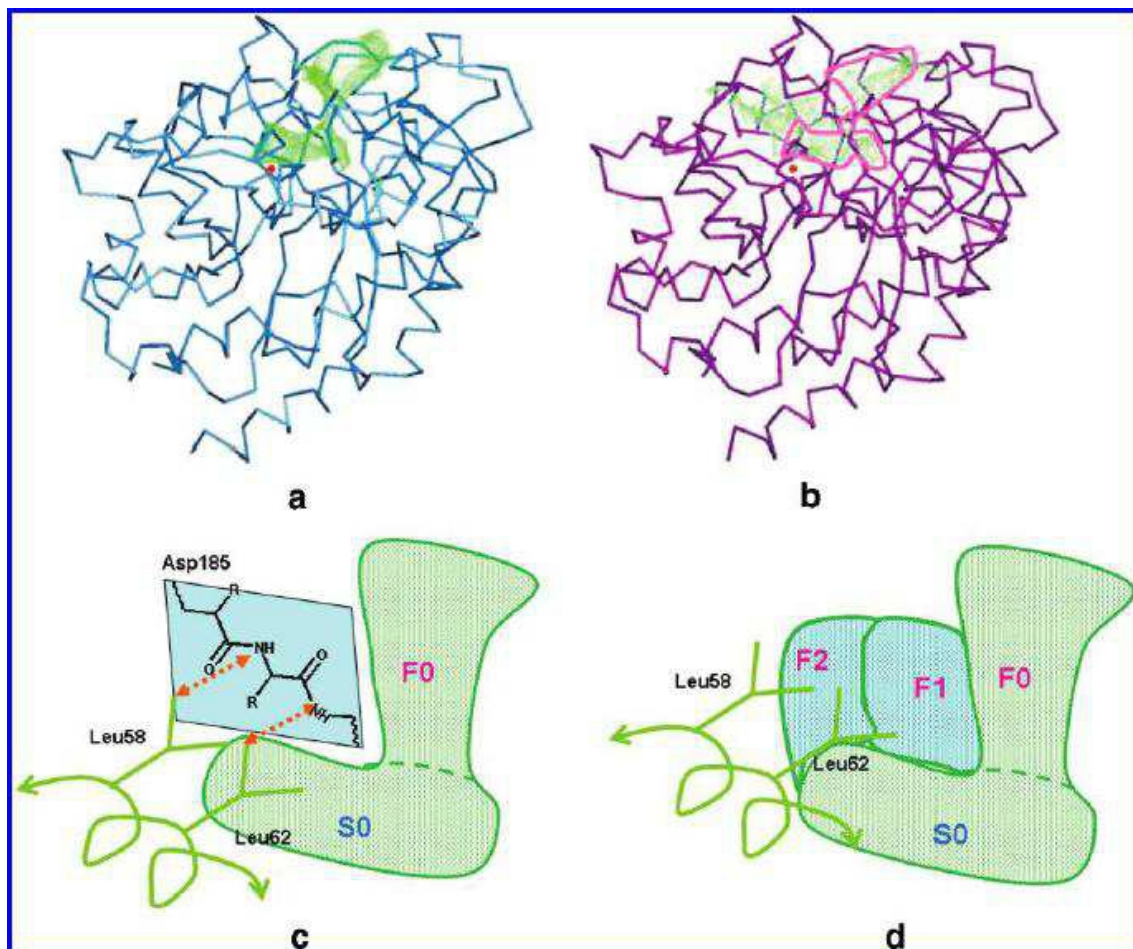


Figura 22. Representación esquemática de las formas abierta y cerrada de la enzima adenosina desaminasa. (a) Forma cerrada y (b) Forma abierta. La conformación global de ambas formas es muy similar, en cambio, el centro activo presenta conformaciones bastante diferentes. El ión Zinc se representa en ambas figuras mediante una esfera roja. (c) Diagrama del centro activo de la forma cerrada que consiste en una zona hidrofílica, S0, y una zona hidrofóbica, F0. La entrada al centro activo, por encima de la zona S0, está formada por el esqueleto polipeptídico correspondiente a la hebra β (Leu182-Asp185) y dos residuos de leucina (Leu58 y Leu62) pertenecientes a la hélice α (Thr57-Ala73), se encuentra cerrada. (d) Diagrama del centro activo de la forma abierta, que consiste en las zonas S0 y F0 de la forma cerrada, más dos zonas hidrofóbicas adicionales, F1 y F2. Estos dos subsitios emergen como consecuencia del movimiento de la hélice α (extraído de Kinoshita *et al.* 2005)

1.4.2 Mecanismo catalítico

Mediante la combinación de técnicas cristalográficas (Wilson *et al.* 1991; Wilson y Quioco 1993; Wang y Quioco 1998), de experimentos de mutagénesis dirigida (Mohamedali *et al.* 1996; Sideraki *et al.* 1996b; Sideraki *et al.* 1996a) y de aproximaciones teóricas basadas en métodos cuánticos (Wu *et al.* 2010), se ha avanzado notablemente en la dilucidación del mecanismo molecular de la reacción catalizada por la ADA. La desaminación enzimática de la adenosina es un proceso en dos etapas. En primer lugar se lleva a cabo la adición estereoespecífica de un grupo hidroxilo de la molécula de agua catalítica (en forma de ión hidróxido) al átomo C6 de la adenosina para formar un intermediario tetraédrico correspondiente al estado de transición. Posteriormente, tiene lugar la eliminación de amonio y la liberación consiguiente de inosina. Los principales eventos que tienen lugar en el mecanismo catalítico son los siguientes:

a) Una molécula de agua constitutiva del enzima enlaza la molécula de agua catalítica unida al ión Zn^{2+} con el residuo de Glu 217 del centro activo antes de la entrada del sustrato. Ello permite la transferencia de un protón desde el agua catalítica al grupo carboxilato del Glu 217.

b) La molécula de agua catalítica se polariza al interactuar con el ión Zn, dado el potente carácter electrofílico de dicho catión, y se orienta adecuadamente respecto al átomo C6 de la adenosina gracias a los enlaces de hidrógeno que establece con los residuos de His 238 y de Asp 295.

c) El residuo protonado de Glu 217 forma enlaces de hidrógeno con el N1 y el grupo 6-NH₂ del sustrato. El grupo -COOH de este aminoácido se encuentra perfectamente alineado para donar su protón al N1 de la adenosina. Ello reduce el carácter del doble enlace N1=C6 y activa al sustrato al hacer que el átomo C6 sea más susceptible al posterior ataque nucleofílico y pueda adoptar el estado de hibridación sp³ en el intermediario tetraédrico correspondiente al estado de transición. En la Figura 23 se muestra un diagrama esquemático de dicho intermediario en el que, además del ión Zn^{2+} , se encuentran los residuos Glu 217, His 238 y Asp 295, respectivamente (Wu *et al.* 2010).

d) Los residuos de His 238 y de Asp 295 colaboran en la formación y posterior estabilización del enlace entre el grupo hidroxilo de la molécula de agua unida al ion Zn^{2+} y el C6 de la adenosina. La localización del ion Zn^{2+} y del residuo Asp295 en el lado B o Pro-S del anillo de adenosina determinan la estereoespecificidad requerida en la adición del ión hidróxido. Por su parte, la His238 actúa de lanzadera del protón desde el grupo hidroxilo coordinado al ión Zn^{2+} al átomo N6 del grupo amino del sustrato.

e) La protonación del grupo $-NH_2$ origina la ruptura del enlace C6–N6 y la consiguiente formación de inosina y de amonio. Se ha postulado que el grupo amino saliente se encuentra en un entorno enzimático muy hidrofóbico (Leu 58, Phe 61, Thr 269 y Phe 300) que le es desfavorable (Wang y Quioco 1998). Esta localización incompatible del NH_3 haría que su eliminación fuese muy rápida y justificaría el carácter irreversible de la reacción catalizada por la ADA.

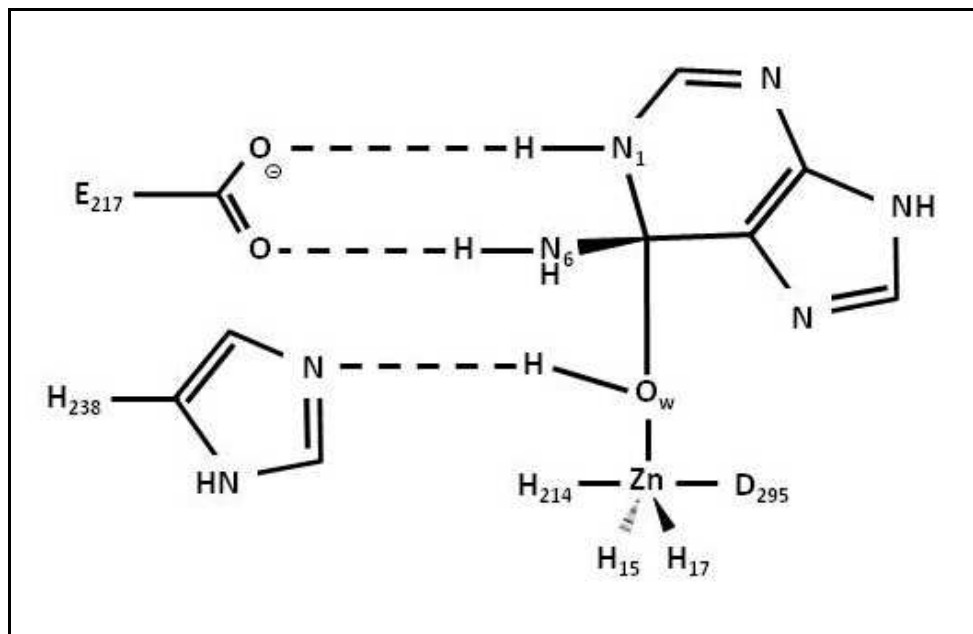


Figura 23. Representación esquemática del intermediario tetrahédrico correspondiente al estado de transición de la reacción catalizada por la ADA (extraído y modificado de Wu *et al.* 2010)

1.4.3 Alteraciones en distintas patologías

Se han detectado variaciones en la actividad de la ADA en una gran variedad de patologías (Cristalli *et al.* 2001). Así se han observado cambios en los niveles del enzima en enfermedades tales como la anemia hemolítica hereditaria (Valentine *et al.* 1977), la tuberculosis (Banales *et al.* 1999), diversas leucemias y linfomas (Hirschhorn

y Ratech 1983; Carlucci *et al.* 1997), el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (Valenzuela *et al.* 1997), la enfermedad del Parkinson (Chiba *et al.* 1995), la artritis reumatoide (Nakamachi *et al.* 2003), el estrés (Miyahara *et al.* 1998), etc. Se ha demostrado que hay un incremento en las cantidades de que la ADA en enfermedades tales como la mononucleosis infecciosa, la hepatitis o la cirrosis (Koehler y Benz 1962), en el líquido cefaloraquídeo en situaciones de meningitis tuberculosa (Piras *et al.* 1978; Ribera *et al.* 1987) o en pacientes con fiebre tifoidea (Piras *et al.* 1978) y en gota (Nishizawa *et al.* 1975). Se ha comprobado que la ADA también juega un papel clave en los sistemas neurológico y vascular (Senba *et al.* 1987; Smits *et al.* 1987), donde se han descrito niveles elevados de la ADA en células sanguíneas de pacientes con patologías neurológicas (Norstrand 1987); además, la ADA es importante en la maduración y diferenciación de las células linfoides (Carson *et al.* 1982) y que también se encuentra implicada en la regulación del sistema inmune en mamíferos (Ralevic y Burnstock 1998).

La ADA desempeña un papel central en el mantenimiento de la competencia inmune. La deficiencia hereditaria de ADA es un desorden metabólico poco frecuente que causa linfopenia e inmunodeficiencia debido a los efectos tóxicos de sus substratos adenosina y 2'-desoxiadenosina. La mayoría de pacientes son niños que presentan el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID). La deficiencia de ADA va asociada aproximadamente a un 15% de todas las clases de SCID y a 1/3 de los casos de SCID autosómicos recesivos, habiéndose detectado más de 30 sustituciones puntuales de aminoácidos en el enzima de dichos pacientes (Hershfield 2003). En ausencia de tratamiento, esta enfermedad es fatal durante el primer año de vida del niño y requiere, por tanto, de una intervención muy rápida (Arredondo-Vega *et al.* 1998). El principal tratamiento para el SCID es el trasplante de médula ósea, si bien se están utilizando otras técnicas alternativas tales como la terapia enzimática sustitutiva, suministrando ADA unida a polietilenglicol, y la terapia génica (Gaspar *et al.* 2009; Ferrua *et al.* 2010). La ADA ha sido utilizada, por lo tanto, como herramienta para el diagnóstico de enfermedades en la práctica clínica como marcador bioquímico de diversos síndromes y patologías infecciosas.

1.4.4 Proteínas de anclaje a la membrana celular (ecto-ADA)

Algunas formas de ADA asociadas a timocitos medulares, células T activadas y células epiteliales presentes en varios tejidos, existen como ecto-enzima debido a la interacción del ADA con la proteína de membrana CD26/dipeptidil peptidasa IV (Kameoka *et al.* 1993; Franco *et al.* 1998). CD26 es una glicoproteína multifuncional con un dominio transmembrana, que actúa como receptor y como enzima proteolítico (Engel *et al.* 2003), y que se expresa como homodímero en la mayoría de tipos celulares, incluyendo los linfocitos T de los cuales es un marcador de activación. La interacción entre CD26 y ADA resulta crítica para la regulación de la señalización de la adenosina y para la potenciación de la proliferación de células T, lo que conduce a un marcado incremento de la sinapsis inmunológica (Dong *et al.* 1996; Dong y Morimoto 1996; Dong *et al.* 1997 Pacheco *et al.* 2005). CD26 también juega un papel importante en la biología tumoral (Wesley *et al.* 1999; Kajiyama *et al.* 2003; Havre *et al.* 2008) y junto con la ecto-ADA se expresan selectivamente en células del linfoma de Hodgkin y en linfomas ALK-positivos (Kameoka *et al.* 2006).

Utilizando técnicas de mutagénesis dirigida y proteínas híbridas de ADA que contenían secuencias de procedencia humana y de ratón, Richard *et al.* (2000, 2002) identificaron los aminoácidos críticos para la unión con CD26, que estaban situados en la hélice α (Pro126-Asp143). Posteriormente, Weihofen y colaboradores (Weihofen *et al.* 2004) cristalizaron el complejo binario constituido por el ectodominio de CD26 humano y por la ADA bovina. La estructura del cristal muestra que cada dímero de CD26 une dos moléculas de ADA. Asimismo se pone de manifiesto la existencia de dos contactos intermoleculares que contribuyen y estabilizan la formación del complejo CD26/ADA (véase Figura 24). La primera interacción se establece entre el bucle A (Ile287-Asp297) de CD26 y la hélice $\alpha 1$ (Arg76-Ala91) de ADA. En la segunda interacción intermolecular participan el bucle B (Asp331-Gln344) de CD26 y la hélice $\alpha 2$ (Pro126-Asp143) de ADA, la misma hélice α descrita por Richard *et al.* (2000 2002) a partir de los estudios de mutagénesis.

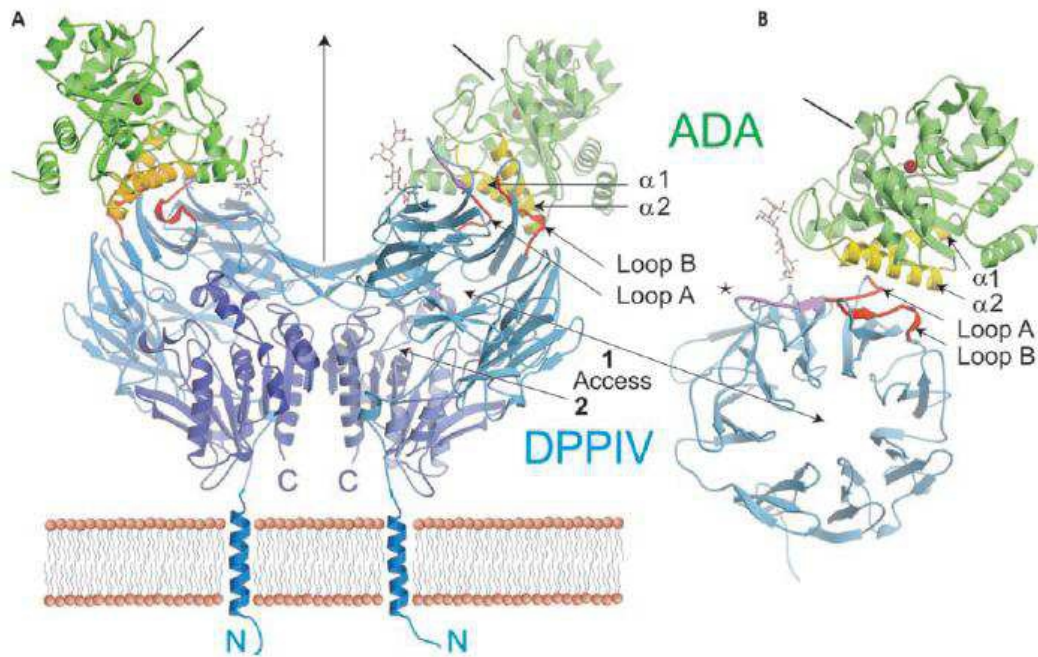


Figura 24. Representación esquemática del complejo (hDPPIV-bADA)₂. La membrana celular y las hélices α que anclan CD26 se representan esquemáticamente. A) Los diferentes dominios de hDPPIV (CD26) se representan en violeta, (hélices α / láminas β) y azul (horquillas β antiparalelas). La ADA bovina está representada en verde con el ión Zn^{+2} de su centro activo representado por una esfera roja. Las zonas de unión entre las dos proteínas se muestra en rojo (bucles A y B de CD26), y en amarillo (hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la ADA bovina). Flecha de acceso 1, muestra el centro activo de CD26 y la flecha de acceso 2 la abertura lateral de la molécula de CD26. En ambos diagramas, la línea en negro en la parte superior de la ADA bovina, muestra el eje central de la estructura barril TIM de la enzima. B) Vista del complejo con un giro de $\sim 40^\circ$ horizontal respecto a la figura A (extraído de Weihofen *et al.* 2004)

La segunda clase de proteínas que unen ecto-ADA incluye a los receptores de adenosina A_1 (Ciruela *et al.* 1996; Saura *et al.* 1996; Sun *et al.* 2005) y A_{2B} (Herrera *et al.* 2001). La unión de ADA, activa o catalíticamente inactiva, al receptor A_{2B} de adenosina incrementa la afinidad por sus ligando y su posterior señalización (Herrera *et al.* 2001). La interacción del ADA es importante ya que el enzima potencia la transducción de la señal y modula la desensibilización de dicho receptor (Ciruela *et al.* 1996; Saura *et al.* 1998). Recientemente también se han descrito las interacciones alostéricas que ejerce el ADA sobre los receptores A_1 (Gracia *et al.* 2008) y A_{2A} (Gracia *et al.* 2011) de adenosina, incrementando la afinidad de éstos por sus ligandos y potenciando la funcionalidad de los receptores, como pasaba con el receptor A_{2B} . A pesar de estos descubrimientos, los dominios moleculares del ADA implicados en las interacciones no han sido estudiados. Además de los complejos binarios entre el ADA y los receptores de adenosina, se han postulado agregados moleculares de orden superior. En este sentido Torvinen *et al.* (2002), han descrito la existencia de complejos heteroméricos funcionales entre ADA, el receptor A_1 y el receptor de dopamina D_1 en

neuronas de la corteza cerebral y han postulado que esta agregación podría ser modulada tanto por dopamina como por adenosina. Por otra parte, Pacheco *et al.* (2005) demostraron que el ADA anclada a la superficie de las células dendríticas, probablemente a través del receptor A_{2B} , se unía a la proteína CD26 expresada en la membrana de células T, induciendo la coestimulación. Esta señal coestimuladora promueve la proliferación de células T con un patrón Th1 y la producción de citocinas proinflamatorias, con lo que se incrementa la respuesta inmune (Climent *et al.* 2009; Martinez-Navio *et al.* 2009).

1.5 RECEPTORES DE DOPAMINA Y VÍAS DOPAMINÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el sistema nervioso central (SNC) se expresan un elevado número de receptores acoplados a proteína G: más del 90% de los receptores de siete dominios transmembrana se expresan en el cerebro y para algunos de ellos su expresión está restringida a este tejido. La combinación de técnicas de inmunohistoquímica, RT-PCR e hibridación *in situ* en diferentes regiones del cerebro ha permitido descubrir que la expresión de estos receptores presenta patrones diferenciales, lo que sugiere que la expresión de un grupo de receptores concretos y no otros, es clave en la regulación de diferentes procesos neurofisiológicos, como la neurotransmisión. Un ejemplo clásico lo constituyen los receptores de dopamina.

1.5.1 La dopamina como neurotransmisor

La dopamina es la principal catecolamina que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro) y controla una gran variedad de funciones como la modulación de la actividad sensorial, la actividad motora, la actividad endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la afectividad y la motivación. La dopamina también ejerce múltiples funciones en el sistema periférico como modulador de la liberación de catecolaminas, de la secreción hormonal, del tono vascular, de la función renal y de la motilidad gastrointestinal (Cooper *et al.* 1996; Missale *et al.* 1998). Como otros neurotransmisores, la dopamina no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pero sí sus precursores fenilalanina y tirosina. La síntesis de dopamina ocurre en el citosol de las terminales nerviosas dopaminérgicas tal como se indica en la Figura 25 (Elsworth y Roth 1997). La liberación de dopamina en la hendidura sináptica tiene lugar mediante un mecanismo clásico de liberación de neurotransmisores: la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje promueve la fusión de vesículas llenas de dopamina con la membrana presináptica, formándose un poro y dando lugar a la exocitosis de la dopamina, que por difusión cruza el espacio de la hendidura sináptica hasta unirse a sus receptores localizados pre- y postsinápticamente. Después de la unión, ocurre un cambio conformacional en el receptor que induce una compleja cadena de eventos intracelulares, y el resultado final de la liberación de dopamina es la activación o inhibición de la neurona postsináptica.

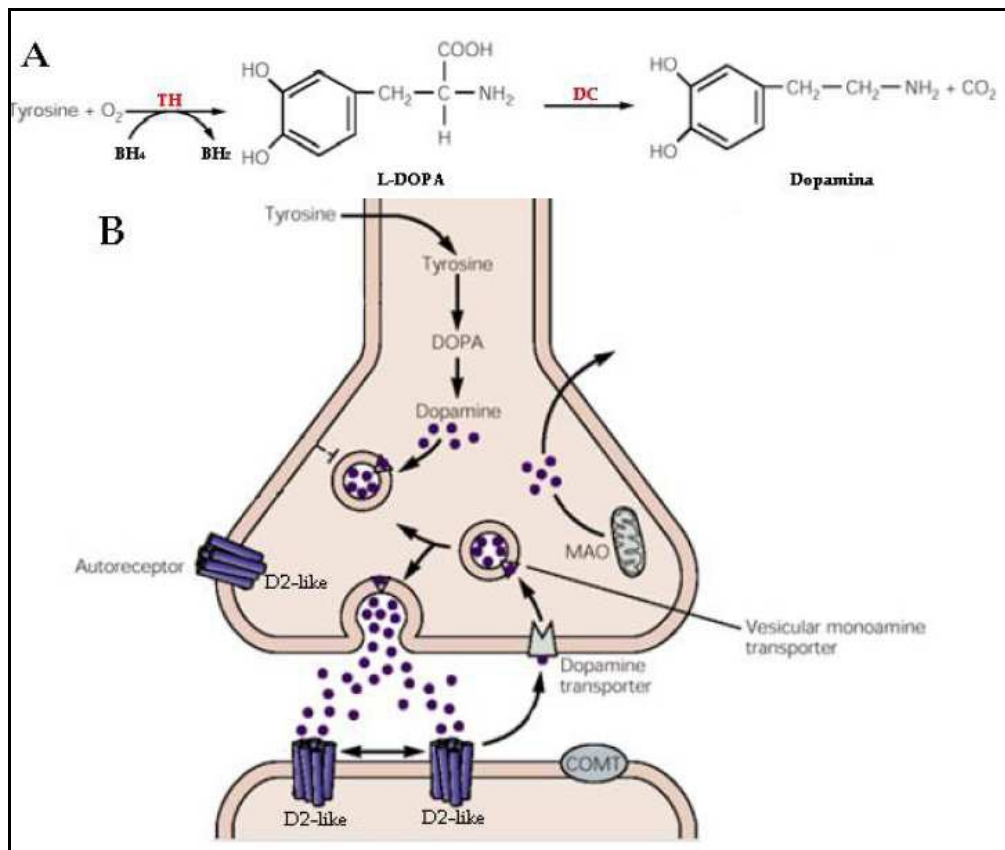


Figura 25. Síntesis de la dopamina A) La tirosina hidroxilasa emplea oxígeno molecular, tirosina y tetrahydrobiopterina (cofactor) para sintetizar L-DOPA, la cual será descarboxilada por la DOPA descarboxilasa dando lugar a dopamina y CO_2 . B) Una vez sintetizada, la dopamina es almacenada en vesículas sinápticas hasta su posterior liberación al espacio sináptico. En él, puede interactuar con sus receptores específicos, ser recaptada y degradada (modificado de Kandel *et al.* 2000)

La señal dopaminérgica finaliza por eliminación de la dopamina del espacio intersináptico, lo que implica mecanismos de recaptación específicos en el terminal presináptico donde puede ser almacenada o metabolizada (Elsworth y Roth 1997). Aunque existen enzimas extraneuronales que catabolizan la dopamina liberada, la finalización del efecto se debe principalmente, a la recaptación del neurotransmisor por los propios terminales nerviosos que la liberaron mediante transportadores específicos (DAT: *Dopamine Transporters*) que juegan un papel importante en la función, inactivación y reciclaje de la dopamina liberada (Adell y Artigas 2004; Sotnikova *et al.* 2006).

Los receptores dopaminérgicos localizados presinápticamente son principalmente, autoreceptores y constituyen uno de los mecanismos responsables de la regulación de la transmisión dopaminérgica (Langer 1997; Koeltzow *et al.* 1998). Cuando la dopamina es liberada al espacio sináptico, la estimulación de los

autoreceptores presentes en las terminales nerviosas induce una inhibición de la liberación continuada de dopamina. Todos los autorreceptores dopaminérgicos pertenecen a la subfamilia D₂-like (Langer 1997; Mercuri *et al.* 1997; Vallone *et al.* 2000). Se han desarrollado numerosos agonistas y antagonistas específicos de los receptores de dopamina lo que ha dado la oportunidad de modular la transmisión dopaminérgica incrementando o bloqueando la acción de este neurotransmisor con fines terapéuticos (Sokoloff *et al.* 2006; Rankin *et al.* 2010; Rondou *et al.* 2010). El sistema dopaminérgico ha sido de gran interés por la relación entre la desregulación de este sistema y algunas patologías tales como el Parkinson, la esquizofrenia, el síndrome de Tourette, la hiperprolactinemia y la adicción a drogas (Missale *et al.* 1998; Segawa 2003; Santini *et al.* 2008; Dalley y Everitt 2009; Zack y Poulos 2009). De hecho, la degeneración de la vía nigroestriatal produce la enfermedad de Parkinson en humanos, caracterizada por una fuerte reducción de la liberación de dopamina (Mercuri *et al.* 1997; Shimohama *et al.* 2003).

1.5.2 Estructura, clasificación y función de los receptores de dopamina

Los receptores de dopamina se clasifican en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: la subfamilia D₁-like, que comprende a los receptores D₁ y D₅, y la subfamilia D₂-like que incluye a los receptores D₂, D₃ y D₄. Los receptores **D₁-like** producen incrementos del AMPc intracelular a través de proteínas G_{s/olf} que estimulan a la AC y se localizan principalmente en los terminales postsinápticos (Neve *et al.* 2004; Nieoullon y Amalric 2002; Missale *et al.* 1998; Civelli *et al.* 1993). Los receptores **D₂-like**, en cambio, inhiben la AC por acoplamiento a proteínas G_{i/o}, además de activar canales de K⁺ y disminuir la entrada de Ca⁺² a través de canales dependientes de voltaje (Gershon *et al.* 2007; Neve *et al.* 2004; Nicola *et al.* 2000; Missale *et al.* 1998). Los receptores D₂-like pueden localizarse en terminales presinápticas y postsinápticas (Dal Toso *et al.* 1989). Los dos subgrupos presentan peculiaridades estructurales diferentes como se muestra en la figura 26: los receptores D₁-like tienen un dominio carboxiterminal unas siete veces más largo que los receptores D₂-like, mientras que estos últimos tienen un tercer bucle intracelular mucho más largo, característica común en muchos receptores acoplados a proteína G_i (Missale *et al.* 1998).

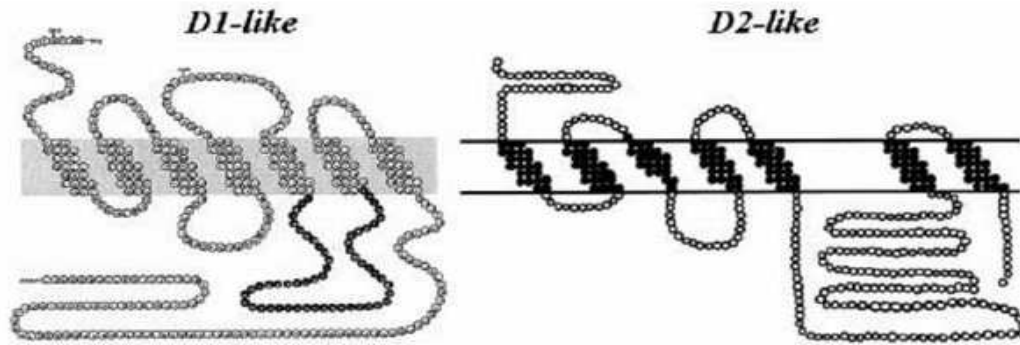


Figura 26. Representación esquemática de las dos subfamilias de receptores de dopamina

Existe una homología del 80% en la secuencia entre los dos miembros de la familia de receptores *D₁-like*. En cambio, la homología es del 75% entre los miembros *D₂* y *D₃* de la familia *D₂-like* y un 53% entre los *D₂* y *D₄* de dicha familia. Por contraste, la homología entre los receptores *D₁-like* y *D₂-like* es solo del 42-46%. La región con homología más elevada es aquella que se encuentra en los dominios de transmembrana y en aquellos residuos que son clave para la unión de catecolaminas. El extremo carboxiterminal, en ambas familias, contiene lugares de fosforilación y palmitoilación que se cree juegan un papel esencial en la desensibilización del receptor y en la formación de un cuarto bucle intracelular, respectivamente. Por el contrario, los receptores de dopamina presentan diferencias en las modificaciones post-traduccionales, como diferentes lugares consenso de N-glicosilación.

Para el estudio de las propiedades farmacológicas de los receptores de dopamina se dispone de ligandos que discriminan fácilmente entre las subfamilias *D₁-like* y *D₂-like*, sin embargo, es mucho más difícil encontrar ligandos selectivos para los miembros de cada subfamilia. Cada uno de los receptores ***D₁-like*** muestra alta afinidad por benzazepinas (SCH23390 y SKF38393) y baja afinidad por butiroferonas (espiperona y haloperidol) y benzanidas sustituidas (supiride). Se ha detectado una diferencia remarcable de su afinidad por la dopamina, presentado el receptor *D₅* una afinidad 10 veces superior a la que presenta el receptor *D₁* (Missale *et al.* 1998).

Dentro de los receptores ***D₂-like*** las afinidades por muchos antagonistas y agonistas pueden variar en uno o dos órdenes de magnitud. Cada uno de estos receptores se caracteriza por tener alta afinidad por butiroferonas, como las espiperonas

y el haloperidol y baja afinidad por benzazepinas como el SKF 38393. De los tres receptores que componen la familia *D₂-like*, el *D₂* tiene las propiedades farmacológicas más distintivas, pues en general, presenta baja afinidad por la mayoría de los antagonistas dopaminérgicos de esta subfamilia, por ejemplo, el raclopride, exhibiendo a su vez una relativa afinidad por el neuroléptico atípico clozapina (Missale *et al.* 1998). En cambio, el receptor *D₃* presenta una afinidad 20 veces mayor por la dopamina que el receptor *D₂*, existiendo algunos ligandos comerciales selectivos como el antagonista GSK 789472. Por último, el receptor *D₄* es el que presenta menor afinidad por la dopamina de entre los miembros de la subfamilia *D₂-like*, existiendo también algunos ligandos sintéticos selectivos para este receptor como el agonista RO 10-5824 o el antagonista L-745,870.

La diferencia de afinidad que presentan los receptores de dopamina por su ligando endógeno puede permitir la activación de unos receptores u otros en función de la cantidad de dopamina liberada. Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos de transducción de señal de cada subtipo de receptor, se puede generar una gran variedad de respuestas a una misma sustancia. Esta diversidad dentro de los receptores de dopamina es un reflejo de la diversidad funcional que ejerce este neurotransmisor, sobre todo si se considera la expresión diferencial de estos receptores dentro del SNC. En la tabla 5 se resume la información más relevante de los diferentes subtipos de receptores de dopamina:

| Familia | <i>D₁R-like</i> | | <i>D₂R-like</i> | | |
|--|--|--------------------------------|---|---|---|
| Subtipo | <i>D₁R</i> | <i>D₅R</i> | <i>D₂R</i> | <i>D₃R</i> | <i>D₄R</i> |
| Proteína G | G_s/oif | G_s/oif | G_{i/o} | G_{i/o} | G_{i/o} |
| Mecanismo de transducción de señal | + AC + PLC | + AC | - AC + PLC - canales Ca²⁺ + canales K⁺ | - AC + PLC - canales Ca²⁺ + canales K⁺ | - AC + PLC |
| Moléculas efectoras | ↑ AMPc ↑ PKA ↑ IP₃ | ↑ AMPc | ↓ AMPc ↑ IP₃ ↓ Ca²⁺ ↑ K⁺ | ↓ AMPc ↑ IP₃ ↓ Ca²⁺ ↑ K⁺ ↑ NKE* | ↓ AMPc ↑ ác. araquid. ↑ NKE* |
| Afinidad por la dopamina K _D en nM | 2340 | 261 | 2,8-474 | 4-27 | 28-450 |
| Agonista K _D en nM | SKF-38393 1-150 | NPA 187 | Quinpirole 4,8-474 | Bromocriptina 5-7,4 | (-) Apomorfina 4 |
| Antagonista K _D en nM | SCH-23390 0,11-0,35 | SCH-23390 0,11-0,54 | Raclopride 1-5 | UH 232 2,9-9,2 | Clozapina 9-42 |

*NKE: Na⁺/K⁺ exchange; intercambiador Na⁺/K⁺.

Tabla 5. Resumen de las principales características de los receptores de dopamina

La expresión de los distintos subtipos de receptores de dopamina en el cerebro ha sido determinada mediante la combinación de técnicas de unión de radioligandos y de hibridación *in situ*. Así se ha demostrado, por ejemplo, que el **receptor D₁** es el más abundante y su distribución es la más amplia de todos los receptores dopaminérgicos (Beaulieu y Gainetdinov *et al.* 2011; Barishpolets *et al.* 2009; Dearry *et al.* 1990); en cambio, el **receptor D₅** presenta una distribución más restringida a regiones tales como el hipocampo o el tálamo (Centonze *et al.* 2003). Estudios de RT-PCR y proteómica han demostrado la expresión del receptor D₁ en el estriado (tanto dorsal como ventral), en el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio, y en menor medida en el sistema límbico, el hipotálamo y el tálamo. La expresión mayoritaria del receptor D₁ se localiza postsinápticamente en las neuronas GABAérgicas estriatales, junto con la expresión de la sustancia P (Gerfen *et al.* 1990). El estudio de Surmeier *et al.* (1996) mostró que el **receptor D₃** se expresa al menos en la mitad de las neuronas GABAérgicas que co-expresan sustancia P y dinorfina (y que conforman la vía directa estriatonigroentopeduncular del movimiento) y en una proporción muy pequeña de neuronas GABAérgicas que expresan encefalina (vía indirecta estriatopalidal). Así, el receptor D₃ podría, de hecho, mediar la mayoría de las interacciones de los receptores de las familias D₁,D₂-like en las neuronas estriatales. Marcellino *et al.* (2008) evidenciaron la existencia de interacciones a nivel molecular entre los receptores D₁ y D₃ en células co-transfectadas y tejido estriatal bovino, mostrando al receptor D₃ como un potenciador de la estimulación de D₁ a nivel neuronal y comportamental; también Fiorentini y colaboradores en el 2008 presentaron resultados que apoyaban la heteromerización D₁-D₃. Además, el receptor D₃, es considerado como una diana prometedora, por su implicación en las discinesias asociadas al tratamiento con L-DOPA en la enfermedad de Parkinson (Bordet *et al.* 1997; Rietschel *et al.* 2000; Guillin *et al.* 2001; Bézard *et al.* 2003; Visanji *et al.* 2009; Cote *et al.* 2014) El **receptor D₄** se expresa en interneuronas GABAérgicas tanto piramidales como no-piramidales de la corteza prefrontal e hipocampo, en el bulbo olfatorio, la amígdala, el mesencéfalo (Missale *et al.* 1998), en la glándula pineal (Klein *et al.* 2010) y en menor medida en el núcleo *accumbens* y estriado (de Almeida y Mengod 2010; Gasca-Martinez *et al.* 2010).

1.5.3 Las vías dopaminérgicas en el SNC

A pesar de que las neuronas que utilizan la dopamina como neurotransmisor en el cerebro son muy pocas, este sistema de neurotransmisión juega un papel esencial en la regulación del movimiento, la conducta y liberación de hormonas (Dale 2000). Los circuitos dopaminérgicos del SNC se pueden dividir en: nigroestriatal, mesolímbico-mesocortical y tuberohipofisario (Figura 27). Las alteraciones de estas tres vías de transmisión se han asociado con diversas enfermedades. Así, la enfermedad de Parkinson se ha asociado con alteraciones en la vía nigroestriatal, la esquizofrenia con alteraciones en la vía mesolímbica-mesocortical y una gran variedad de alteraciones hormonales con anomalías en la vía tuberoinfundibular (Dale 2000).

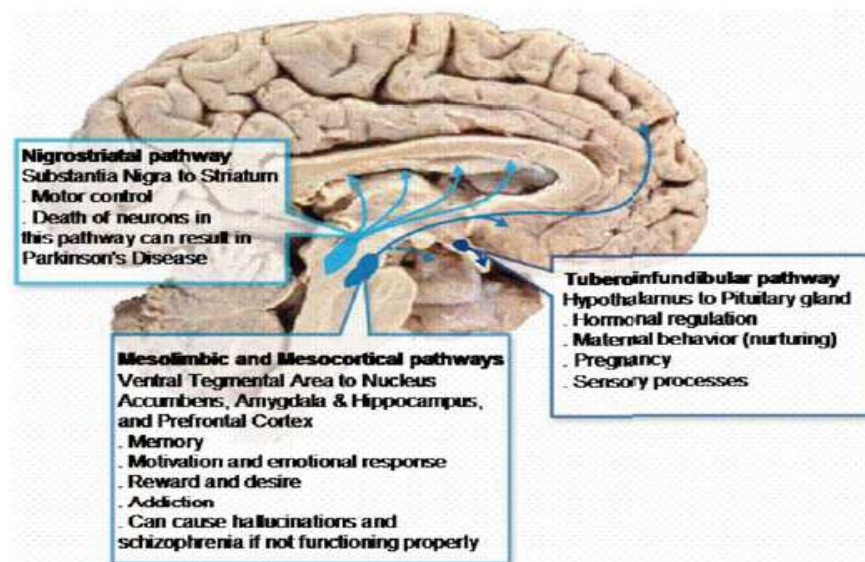


Figura 27. Representación de los circuitos dopaminérgicos (cedido por el Dr. Sergi Ferré)

El **sistema nigroestriatal** se origina en la sustancia *nigra*, que es un núcleo de neuronas localizado en el mesencéfalo. Este se divide en dos partes: la compacta, formada por neuronas dopaminérgicas, y la reticulata, formada principalmente por neuronas GABAérgicas. Las neuronas dopaminérgicas con origen en la sustancia *nigra* constituyen el principal conducto dopaminérgico en el cerebro, y proyectan axones que proporcionan una densa inervación al núcleo caudado y al putamen del estriado; aproximadamente un 80% de toda la dopamina que se encuentra en el cerebro se halla en el estriado. Este sistema es el implicado en la regulación motora y la ejecución de tareas, permitiendo que el movimiento se realice de forma armoniosa y obedezca a las órdenes voluntarias del individuo de acuerdo con patrones motores bien establecidos (Flórez y Pazos 2003). Un ejemplo es lo que ocurre en los pacientes con Parkinson en los que se produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal,

dando lugar a claras anomalías motoras. La inervación dopaminérgica hacia regiones límbicas y corticales también está alterada, aunque en menor medida y, al parecer, la enfermedad no se manifiesta hasta que la pérdida neuronal en el estriado representa el 80% (Elsworth y Roth 1997).

El **sistema mesolímbico-mesocortical** tiene su origen en el área tegmental ventral, también localizada en el mesencéfalo. Dicho núcleo contiene células dopaminérgicas que envían proyecciones a la corteza frontal y el lóbulo límbico, conformando los circuitos mesocortical y mesolímbico respectivamente. El sistema mesolímbico se distribuye por el sistema límbico con excepción del hipocampo; principalmente se proyecta hacia el núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio, núcleo central de la amígdala, *septum* lateral y núcleo intersticial de la estría terminal (Flórez y Pazos 2003). El sistema mesocortical se proyecta desde la sustancia *nigra* y el área tegmental ventral hacia las cortezas motoras, promotoras y suplementarias y a las cortezas parietal, temporal y cingular posterior, es decir, hasta las principales aéreas sensorimotoras y de asociación. Ambos sistemas contribuyen a mantener la atención, la ideación, la evaluación correcta de la realidad, la motivación y el control del pensamiento (Flórez y Pazos 2003), es decir, están implicados en todos aquellos procesos en los que la motivación forma parte esencial de la conducta, ya sea fisiológica para atender necesidades elementales del individuo, o patológica, creada por hiperestimulación del sistema, que es lo que ocurre en procesos de adicción a sustancias de abuso. Los mecanismos implicados en estos últimos procesos se denominan sistemas de premio o recompensa, ya que son circuitos que al activarse producen un efecto placentero (Wise 1996). La mayoría de sustancias que provocan adicción, interaccionan directa o indirectamente con proteínas presentes en las neuronas dopaminérgicas a nivel de la vía mesolímbico-mesocortical, provocando un incremento de la liberación de dopamina por la neurona presináptica hacia el espacio extracelular. La continua administración de estas sustancias produce una activación continua de la liberación de dopamina, consiguiéndose sensaciones positivas, perdiéndose la sensibilidad a estímulos habituales. Cuando se interrumpe administración aparecen sensaciones desagradables, depresión o falta de motivación (Noble *et al.* 1994) (Figura 28).

El sistema mesolímbico-mesocortical parece jugar un papel importante en el desarrollo de la esquizofrenia. Las conexiones con el núcleo *accumbens* tienen una

especial relevancia, ya que la falta de regulación de las vías dopaminérgicas mesolímbicas provocarían una descoordinación en el núcleo *accumbens* que, a su vez, sobreestimularía ciertas regiones implicadas en el procesamiento de la información de los sentidos, contribuyendo a los síntomas positivos de la esquizofrenia (alucinaciones, delirios, pensamientos incoherentes,..). Por otro lado, dado que las vías dopaminérgicas mesocorticales juegan un papel fundamental en el buen funcionamiento cognitivo de la corteza prefrontal, las alteraciones en este sistema estarían relacionadas con los síntomas negativos de la esquizofrenia (aislamiento social, retraimiento social, falta de iniciativa) (Pani 2002; Abi-Dargham 2004).

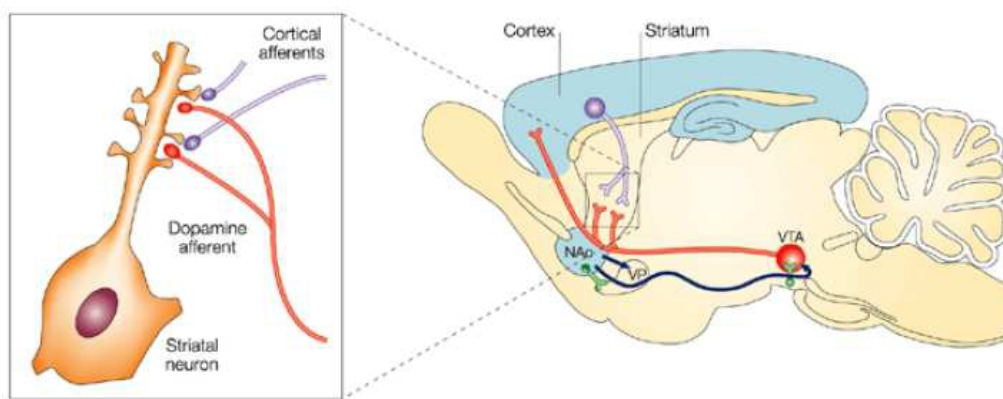


Figura 28. El circuito mesolímbico (cerebro de roedor) (extraído de Hyman 2007)

Por último, el **sistema tuberohipofisario** se origina en el hipotálamo y se proyecta hacia la hipófisis. Las neuronas del sistema tuberohipofisario desempeñan un papel importante en la regulación de la liberación de las hormonas pituitarias, como por ejemplo la prolactina, en la que la dopamina juega un papel inhibitorio en la liberación de esta hormona (Dale 2000).

En las situaciones patológicas que se han comentado anteriormente se han observado diferencias cuantitativas en cuanto a la expresión de los receptores de dopamina o bien en su señalización. Por ejemplo, los receptores D_1 se ven incrementados en la esquizofrenia y su señalización varía en la enfermedad de Parkinson. La densidad de los receptores D_2 localizados postsinápticamente incrementa en la esquizofrenia y también en los enfermos de Parkinson no tratados con L-DOPA (profármaco que, a diferencia de la dopamina, puede traspasar la barrera hematoencefálica, y es un precursor biológico de la dopamina) (Missale *et al.* 1998; Vallone *et al.* 2000; Carlsson *et al.* 2001; Fuentes *et al.* 2010; Beaulieu y Gainetdinov

2011). Es por ello que el estudio de los receptores de dopamina es muy importante, tanto para poder entender una gran cantidad de anomalías funcionales tales como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia e hiperactividad, como para crear nuevas dianas terapéuticas para dichas anomalías (Missale *et al.* 1998; Segawa 2003; Sokoloff *et al.* 2006; Santini *et al.* 2008; Dalley y Everitt 2009; Zack y Poulos 2009; Rankin *et al.* 2010; Rondou *et al.* 2010).

1.5.4 Los ganglios basales

Los ganglios basales (GB) se hallan en la base del cerebro, y están constituidos por cinco núcleos principales en roedores: el estriado, la sustancia *nigra* o negra, el *globus pallidus* externo (GPe), el núcleo subtalámico y el núcleo entopeduncular o EPN (en los primates el *globus pallidus* interno o GPi). El estriado es la principal estructura de entrada de los GB y está funcionalmente subdividido en estriado dorsal y ventral (en rata, Figura 29; en primates no-humanos Figura 30).

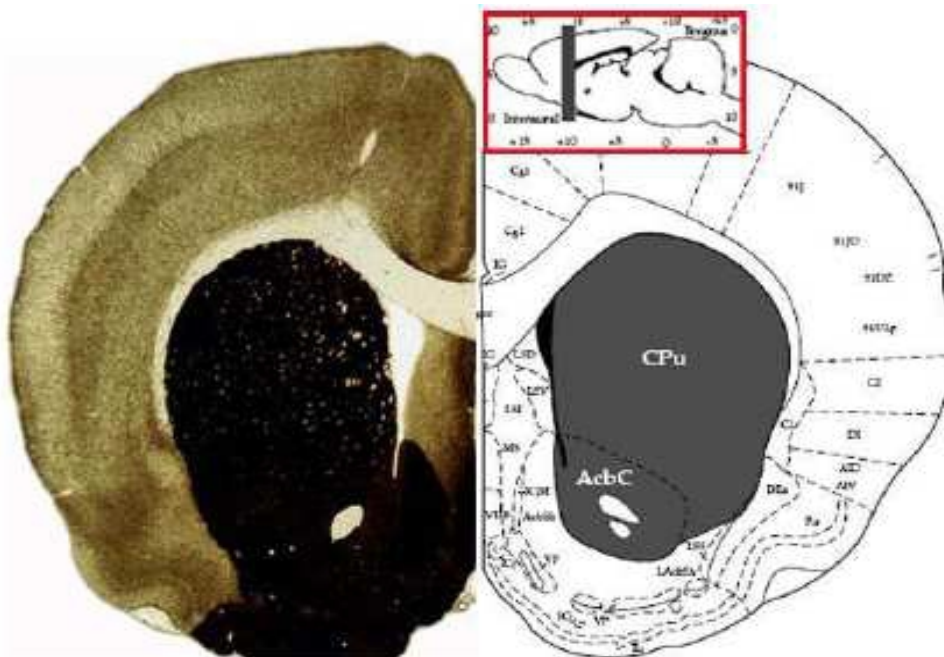


Figura 29. Localización del estriado dorsal y ventral en el cerebro de rata. Bregma 2.16mm. CPU: caudado-putamen; AcbC: *nucleus accumbens core* (extraído de Paxinos y Watson 2005)

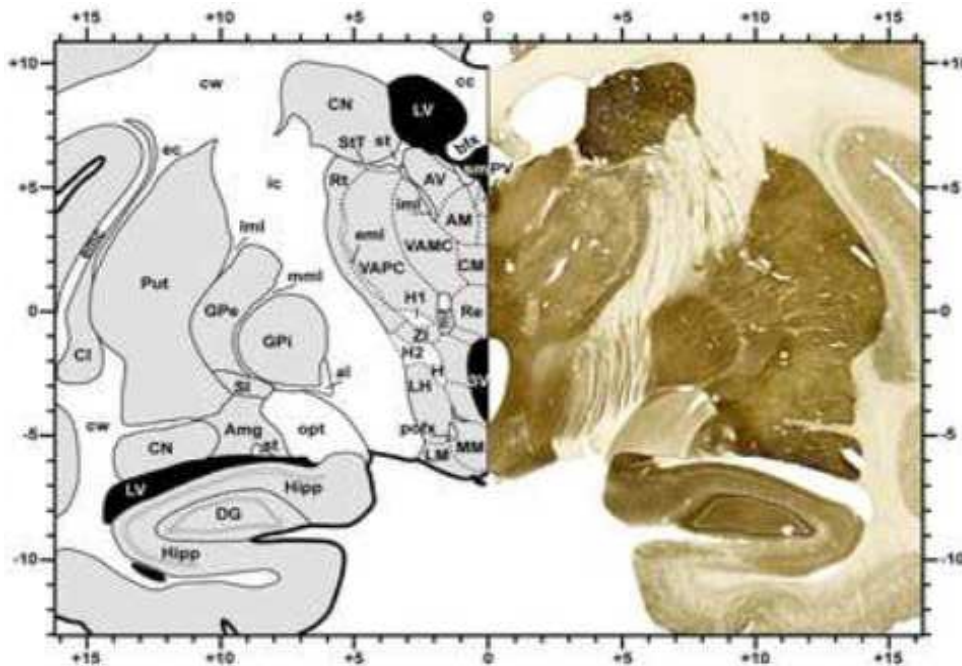


Figura 30. Estructura de los GB y del tálamo de *Macaca fascicularis*. Tinción ACh-E sección coronal 12 ac -5.5mm. CN: núcleo caudado; Put: Putamen; GPi: globo pálido interno; GPe: globo pálido externo (extraído de Lanciego y Vázquez 2012)

Los distintos componentes anatómicos de los GB se encuentran clasificados en tres grupos: núcleos de entrada, núcleos de salida y núcleos intrínsecos. Como ya se ha descrito anteriormente, el núcleo de entrada es el cuerpo estriado, que engloba el estriado dorsal (núcleo caudado y putamen), implicado en la ejecución y aprendizaje de actos motores complejos, y el estriado ventral (núcleo *accumbens*), que forma parte de los circuitos cerebrales implicados en la conversión de la motivación en acción. En el estriado, más del 90% de las neuronas son GABAérgicas de proyección o *medium-size spiny neurons* (MSN) y reciben dos vías de entrada que convergen en sus espinas dendríticas: por un lado las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, localizadas en la sustancia *nigra pars compacta* y el área ventral tegmental y por otro lado las neuronas glutamatérgicas procedentes de áreas corticales, límbicas y talámicas (hipocampo y amígdala) (Gerfen 2004). Los núcleos de salida comprenden el GPi, ENT y la porción reticulada de la sustancia negra (SNr). Finalmente, los núcleos intrínsecos son el GPe, el núcleo subtalámico (STN) y la porción compacta de la sustancia negra (SNc).

Antes de que se ejecute un programa motor, la información es enviada desde la corteza a los GB, donde la señal se contrasta con entradas sensoriales y se transforma antes de regresar de nuevo a la corteza a través del tálamo (Schultz 2010).

El modelo de funcionamiento de los GB descrito por Crossman (Crossman 1987), Albin y colaboradores, (Albin *et al.* 1989) y DeLong (DeLong 1990), explica cómo se procesa la información a través de los circuitos que constituyen los GB tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Figura 31).

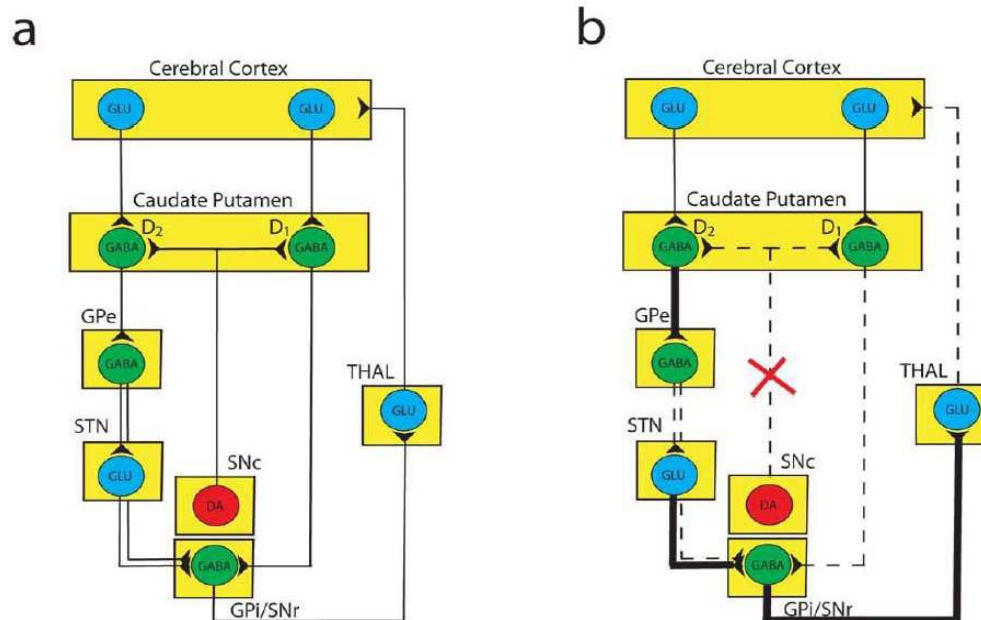


Figura 31. Funcionamiento simplificado de los GB en primates. Existen dos vías de salida u *outputs* del estriado: la vía directa, que proyecta del estriado al núcleo GPi/SNr, y la vía indirecta, que conecta el estriado con el GPe – STN- GPi/SNr. **a)** estado “normal” y **b)** Degeneración de la SNc en la enfermedad de Parkinson que hace disminuir la liberación de dopamina en el estriado (Cedido por el Dr. Sergi Ferré).

Existen dos subtipos de neuronas GABAérgicas eferentes en el estriado, que proyectan al tálamo a través de dos vías: las neuronas estriatopalidales externas (del GPe) y las neuronas estriatonigroentopedunculares en roedores o estriatopalidales internas (del GPi) en primates. Los dos tipos de neuronas GABAérgicas estriatales se pueden distinguir neuroanatómicamente. (Levesque y Parent 2005). Así, las neuronas del estriado que proyectan al GPe forman la **vía indirecta**, y contienen el péptido encefalina, receptores de dopamina (predominantemente del subtipo D₂) y receptores A₁ y A_{2A} de adenosina, entre otros. Las neuronas estriadas que proyectan hacia el GPi, y que conforman la **vía directa**, contienen dinorfina, sustancia P, receptores de dopamina (predominantemente del subtipo D₁) (Gerfen *et al.* 1990; Alexander y Crutcher 1990) y receptores A₁ de adenosina, pero no receptores A_{2A} (Ferré *et al.* 2007; Schiffmann *et al.* 2007).

La estimulación de la vía directa produce activación motora, mientras que la de la vía indirecta produce inactivación motora. Esto es así puesto que la vía directa tiende

a activar los movimientos voluntarios, y la vía indirecta a inhibir la aparición de componentes involuntarios en el movimiento. Un adecuado equilibrio entre las dos produce los movimientos normales.

Por tanto, como acabamos de ver, la dopamina liberada en el estriado presenta un efecto dual, debido a que activa los receptores D₁ e inhibe los D₂. En primates, provoca la activación del movimiento por estimulación de los receptores D₁ de las neuronas de proyección de la vía directa, mientras que deprime la actividad de las neuronas de la vía indirecta actuando sobre los receptores D₂ produciendo también, indirectamente, una activación motora (Alexander y Crutcher 1990). La dopamina por tanto, estimula el movimiento a través de las dos vías, porque estimula la vía estimuladora e inhibe a la vía inhibidora (ver Figura 31a).

Aunque en el modelo clásico descrito las neuronas dopaminérgicas de la SNC proyectan exclusivamente al estriado, se han encontrado proyecciones dopaminérgicas de la SNC hacia otros núcleos de los GB como GPe (Smith y Kieval, 2000), GPi (Jan *et al.* 2000), STN (François *et al.* 2000) y varios núcleos talámicos (Sánchez-González *et al.* 2005).

Por otra parte, según los datos anatómicos, neuroquímicos y electrofisiológicos publicados en los últimos años, el circuito de los GB no puede considerarse únicamente como un sistema en el que la información fluye de manera unidireccional desde el estriado hacia los núcleos de salida a través de una vía directa y otra indirecta. Los núcleos que componen el circuito forman una red muy compleja donde la información fluye de manera multidireccional y se originan microcircuitos que regulan de forma conjunta la señal de salida hacia el tálamo. En la Figura 32 se muestra una visión más moderna del circuito de los GB en la que se recogen las proyecciones descritas hasta el momento y que da una idea de la complejidad del sistema (Obeso y Lanciego 2011). En la actualidad, el esquema de funcionamiento de los GB tiene como base el modelo clásico descrito anteriormente pero incluye otros núcleos colaterales importantes en la regulación del circuito y nuevas proyecciones no descritas en el modelo anterior.

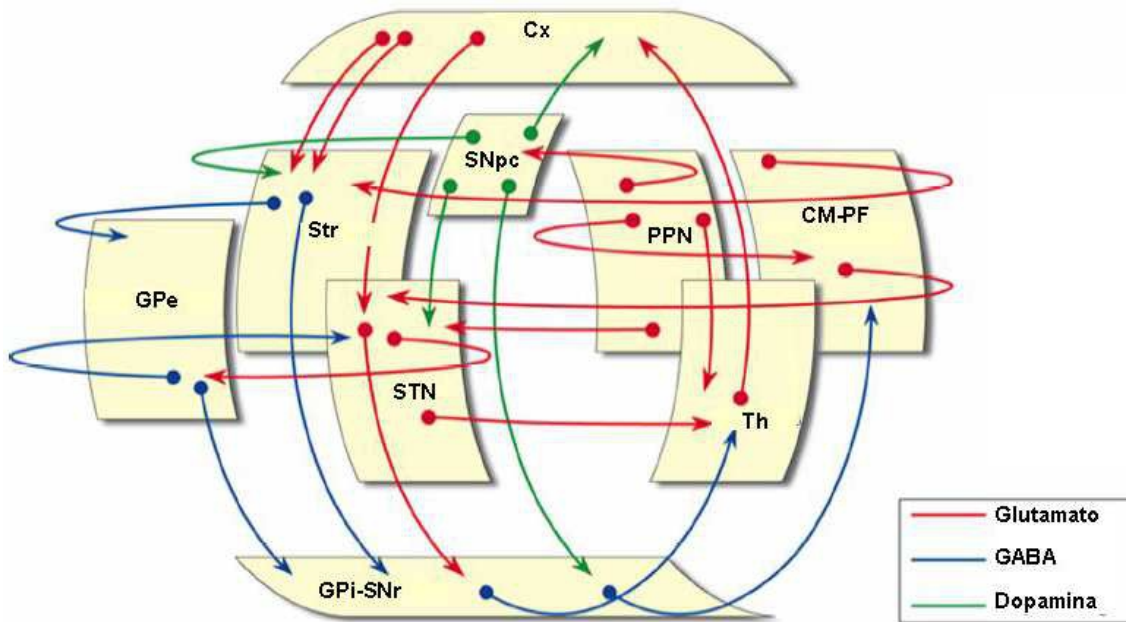


Figura 32. Esquema actualizado de las conexiones anatómicas de los núcleos de los GB y núcleos relacionados. Cx, corteza, Str, estriado; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; STN, núcleo subtalámico; SN_{pc}, sustancia negra *pars compacta*; SNr, sustancia negra reticulada; Th, tálamo; PPN, núcleo pedunculopontino; CM-PF, núcleo centro mediano-parafascicular del tálamo (modificado de Obeso y Lanciego 2011)

1.5.5 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez el 1817 por James Parkinson, es la segunda patología neurodegenerativa más común en la población, y está producida por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que proyectan de la sustancia negra al estriado (caudado más putamen). Esto da lugar a, por un lado, la disminución de la activación de los receptores D₁ de dopamina en las neuronas estriatales de la vía directa, reduciéndose la inhibición que ejercen estas neuronas sobre los núcleos de salida. Por otro lado, los receptores D₂ de dopamina dejan de estar inhibidos y las neuronas de la vía indirecta están más activas, aumentando la inhibición que ejercen sobre el GPe (Obeso *et al.* 2008).

Finalmente, se acaba provocando la inhibición del tálamo, que no enviará la señal de vuelta a la corteza dando lugar al desarrollo de los síntomas clínicos de la EP (Figura 33b).

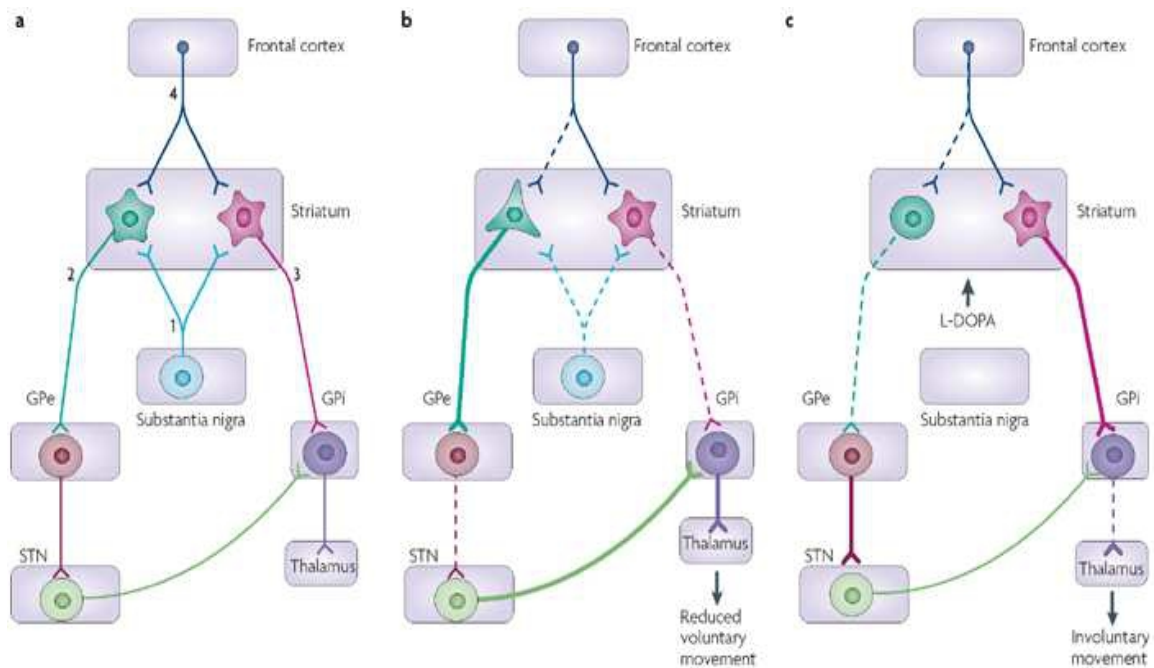


Figura 33. Interconexiones entre las estructuras de los GB en diferentes situaciones patológicas. a) estado sano **b)** enfermedad de Parkinson **c)** administración crónica de L-DOPA en patología de Parkinson; 1-vía nigroestriatal 2-vía indirecta inhibitoria del movimiento, 3-vía directa excitadora del movimiento, 4-vía corticoestriatal. (Extraído de Jenner 2008)

Los síntomas clínicos más relevantes incluyen bradicinesia (lentitud en los movimientos), rigidez, temblor en reposo y alteraciones en el equilibrio (Tabla 6). Cuando se presentan estos síntomas, una gran proporción (50-70%) de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* se han perdido, originándose una reducción de la síntesis y la liberación de dopamina en los terminales que proyectan al estriado. El distintivo patológico de la EP es la formación de cuerpos de Lewy (CL) en las neuronas dopaminérgicas que sobreviven. Los CL son inclusiones intracitoplasmáticas eosinófilas compuestas predominantemente por ubiquitina, α -sinucleína y parkina (Spillantini *et al.* 1997; Schlossmacher *et al.* 2002). Recientemente, Beyer y colaboradores (Beyer *et al.* 2010) han destacado la correlación entre las diferentes isoformas de la α -sinucleína y las enfermedades de CL, entre ellas la EP.

Los principales receptores involucrados en la enfermedad de Parkinson son los receptores predominantes en las vías alteradas implicadas, los D_1 (vía directa) y D_2 (vía indirecta) de dopamina, localizados mayoritariamente en el estriado cerebral (Foley *et al.* 2004), aunque otros receptores de GPCR podrían participar en su modulación.

| Rasgos motores | Rasgos no motores |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Bradicinesia | Demencia |
| Rigidez muscular | Depresión |
| Inestabilidad postural | Apatía |
| Temblor en reposo | Ansiedad |
| Distonías | Déficit cognitivo |
| Alteración de la marcha | Alucinaciones |
| Movimientos acelerados incontrolados | Desórdenes del sueño |
| Pérdida de expresión en el rostro | Trastornos obsesivos-compulsivos |

Tabla 6. Principales características de la EP

El factor que se relaciona más significativamente con la aparición de la EP es la edad o el envejecimiento, aunque se sabe poco cómo está involucrado dicho proceso (Hindle *et al.* 2010). La explicación habitual es la mayor vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a causa del fallo fisiológico y bioquímico de los procesos celulares normales. En general, se ha descrito que la muerte neuronal que tiene lugar en las enfermedades neurodegenerativas se debe a tres mecanismos moleculares interrelacionados: estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteración de los mecanismos de degradación proteica (Kitada *et al.* 1998, Malkus *et al.* 2009, Bove y Perier 2012). En la etiología de la EP existe también un elemento genético significativo, al menos en una parte de los pacientes, en los que se han identificado mutaciones en diferentes genes en lo que se ha denominado casos de enfermedad de Parkinson familiar (Kitada *et al.* 1998; Krüger *et al.* 1998; Leroy *et al.* 1998; Piccini *et al.* 1999; Tanner *et al.* 1999; Sveinbjornsdottir *et al.* 2000; Gasser 1998; Bonifati *et al.* 2002). Por otra parte, otros autores han estudiado el papel de las modificaciones post-traduccionales (como la fosforilación, ubiquitinación, nitración y truncamiento) de la α -sinucleína en la formación de agregados, dentro de la patogénesis de las demencias con cuerpos de Lewy (DCL) (Beyer y Ariza 2013). Recientemente, fruto del estudio de polimorfismos genéticos, se ha descubierto el primer biomarcador genético (que comprende hasta 4 polimorfismos de la enzima butirilcolinesterasa) que permite diagnosticar la DCL, y que se encuentra hasta en un 20% de los casos de esta enfermedad (Beyer 2013); este hallazgo es importante puesto que en la práctica permite un mejor diagnóstico diferencial respecto otras demencias.

El tratamiento paliativo de esta enfermedad consiste en suministrar un precursor de dopamina, la L-DOPA (levodopa o 1-3,4-dihidroxifenilalanina), que aunque es efectivo en los primeros estadios de la enfermedad, acaba por perder la efectividad y provoca la aparición de complicaciones motoras como las discinesias (Nutt 1990). Actualmente, existen avances importantes en el desarrollo de nuevos fármacos dopaminérgicos y no dopaminérgicos (adrenérgicos, inhibidores de la monoaminoxidasa, GABAérgicos, etc.) para la EP, así como para las complicaciones motoras de las terapias en uso (Schapira *et al.* 2006; Huot *et al.* 2013).

1.5.6 Discinesias inducidas por el tratamiento de L-DOPA

Aproximadamente del 50% de los pacientes con EP experimentan las discinesias (movimientos anormales involuntarios) inducidas por L-DOPA (DIL) 4 o 5 años después del inicio con el tratamiento con levodopa (Fahn 2000). Afortunadamente, el porcentaje de pacientes que presentan una forma de DIL que empeora sustancialmente la calidad de vida y requiere de una intervención es mucho menor del 50% (Chapuis *et al.* 2005). Con el fin de prevenir o de mejorar la aparición de esta alteración motora, se reduce la dosis de levodopa (o puede cambiarse a otras formas de liberación sostenida) y habitualmente se añaden al tratamiento medicamentos no dopaminérgicos, con menor eficacia anti-parkinsoniana, y que acaban encareciendo el coste farmacológico de la enfermedad (Maurel *et al.* 2001).

Las DIL son el resultado de los efectos combinados de la degradación de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y del tratamiento pulsátil con levodopa. Así, aparecen como consecuencia de la hipofunción del GPi/SNr que lleva a la desinhibición de las neuronas talámicas y a la excesiva actividad de la influencia reforzadora de los GB sobre la corteza motora (Figura 33c). El tratamiento pulsátil con L-DOPA exagera más la supersensibilidad de los receptores D₁ de dopamina y es la causa de los cambios en la expresión de genes y proteínas estriatales que establecen y mantienen un estado propenso a la aparición de las discinesias (Bonito-Oliva *et al.* 2011; Feyder *et al.* 2011).

Aunque la causa molecular de las DIL no está del todo clara, diferentes trabajos han mostrado el receptor de dopamina D₃ como una diana prometedora en las DIL, ya que se encuentra sobreexpresado en los ganglios basales de los modelos de DIL de roedores y primates no humanos (Todd *et al.* 1996; Bordet *et al.* 1997; Bézard *et al.*

2003; van Kampen y Stoessl 2003; Guigoni *et al.* 2005). En esta línea se ha visto por ejemplo que el uso del agonista parcial de D₃, BP 897, alivia los síntomas de la discinesia sin alterar los beneficios del tratamiento con levodopa, mientras que el uso de antagonistas de D₃, tanto selectivos como no selectivos, reducen la disquinesia, a expensas de empeorar el parkinsonismo (Bézar *et al.* 2003). Otros candidatos prometedores que podrían emplearse como adyuvante en la terapia con levodopa, serían los antagonistas del receptor A_{2A}. El mecanismo de acción de éstos se basaría en que su uso facilitarían los efectos de la dopamina a través de la vía directa que promueve el movimiento, mejorando indirectamente los efectos antiparkinsonianos de la activación del receptor D₁ de dopamina (Pinna *et al.* 1996; Pollack y Fink 1996). Nuestro grupo y otros, hemos descrito interacciones antagonizantes entre el receptor A_{2A} y los de dopamina D₂ o D₃ entre heterómeros (Hillion *et al.* 2002; Canals *et al.* 2003; Ferré *et al.* 2004; Torvinen *et al.* 2005; Fuxe *et al.* 2007; Schiffmann *et al.* 2007). Finalmente, los receptores de cannabinoides CB₁ también tienen un papel clave, llegándose a sugerir que el bloqueo de receptores CB₁ podría prevenir de la bradiquinesia típica del Parkinson (García-Arencibia *et al.* 2009; Orgado *et al.* 2009). Este hecho se basa en los resultados de Sagredo y colaboradores (Sagredo *et al.* 2007) que han observado una regulación a la baja de los receptores CB₁, que tendrían un rol de neuroprotección frente a la citotoxicidad estimulada por la progresión de la EP (Sagredo *et al.* 2007).

1.5.7 Modelos animales para el estudio de la enfermedad de Parkinson

Dado que en la actualidad no existe ninguna cura para la EP y su etiología sigue siendo desconocida, es necesario estudiar los mecanismos subyacentes a la neurodegeneración dopaminérgica y buscar nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de nuevos fármacos para tratar la enfermedad. Para ello, es necesario el uso de modelos animales que emulen la denervación dopaminérgica y los síntomas principales de la EP. El modelo perfecto tendría que presentar cuatro características fundamentales (Beal 2010). En primer lugar, el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc debería ser normal en el momento del nacimiento del animal y debería disminuir selectiva y gradualmente durante la edad adulta hasta alcanzar una pérdida neuronal de más del 50%. La muerte neuronal se puede inducir mediante el tratamiento con neurotoxinas o mediante mutaciones genéticas, en cuyo caso el modelo debería basarse

en una única mutación para facilitar el cruzamiento. En segundo lugar, el animal debería desarrollar déficits motores que incluyan los síntomas principales de la enfermedad (bradicinesia, rigidez y temblor en reposo). En tercer lugar, deberían formarse cuerpos de inclusión a medida que avanza la neurodegeneración. Por último, el desarrollo del parkinsonismo debería ocurrir en tiempos no más largos de unos pocos meses para disminuir el coste de los experimentos y permitir así probar distintas estrategias terapéuticas en menos tiempo. Este modelo animal ideal no existe, por lo que en cada caso es necesario seleccionar el más adecuado de entre los que hay disponibles.

Los modelos tradicionales de EP se basan en el uso de neurotoxinas que inducen la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas. Algunos de estos compuestos son la reserpina, la metanfetamina, la rotenona, el paraquat, el maneb, la 3-nitrotirosina, la 6-OHDA y el MPTP (Betarbet *et al.* 2000, Betarbet *et al.* 2002; Dauer y Przedborski 2003). Los modelos más utilizados en la actualidad son el modelo de rata lesionada con 6-OHDA y los modelos de ratón y de primate lesionados con MPTP. Por otro lado, tras la descripción de las mutaciones causantes del parkinsonismo familiar se han generado nuevos modelos de ratones transgénicos que presentan modificaciones en genes relacionados con la enfermedad, como por ejemplo la α -sinucleína (Dawson *et al.* 2010).

1.5.7.1 Lesión dopaminérgica inducida por 6-OHDA

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA, Figura 34A) es la toxina más utilizada para inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la rata. La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que es necesario inyectarla mediante cirugía estereotáxica para que induzca selectivamente la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Blandini *et al.* 2008). La citotoxicidad de la 6-OHDA se debe a su actividad pro-oxidante, ya que tras su inyección es transportada a través del DAT al interior de las neuronas dopaminérgicas donde promueve la formación de ROS que activan los mecanismos de muerte neuronal (Figura 35) (Dauer y Przedborski 2003, Betarbet *et al.* 2002). La lesión obtenida es altamente reproducible y permite controlar el grado de depleción dopaminérgica según el lugar de la inyección y el tiempo transcurrido desde la aplicación de la neurotoxina. La inyección de la 6-OHDA en el fascículo prosencefálico medial (MFB) o en la SN origina una lesión total, en la que la neurodegeneración comienza a las 24 horas de la inoculación de la toxina. Por otro lado,

la administración de la 6-OHDA en el estriado origina una lesión parcial que es estable en el tiempo y que permite evaluar la eficacia de compuestos neuroprotectores. El grado de lesión parcial se puede controlar mediante el número y la localización de las inyecciones de la 6-OHDA en el estriado (Kirik *et al.* 1998). Además, en la mayoría de los casos la inyección es unilateral, de modo que un hemisferio cerebral no presenta pérdida neuronal y se utiliza como control interno. Este tipo de lesión unilateral provoca una conducta rotacional asimétrica que depende del grado de lesión dopaminérgica y que se puede evaluar tras la inyección de anfetamina o apomorfinina. Esto supone una gran ventaja ya que permite cuantificar el grado de lesión *in vivo* (Kirik *et al.* 1998, Yuan *et al.* 2005). Sin embargo, este modelo no presenta una de las características principales de la enfermedad: la presencia de cuerpos de inclusión proteicos.

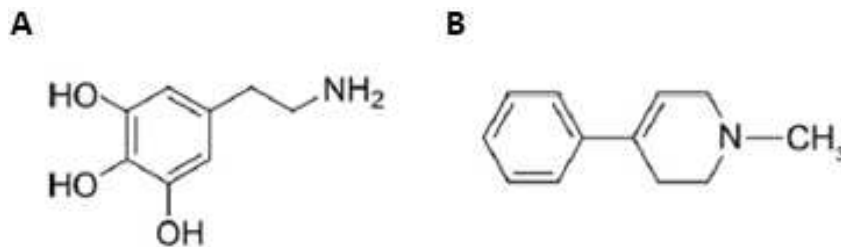


Figura 34. Estructura química de la 6-OHDA (A) y del MPTP (B)

1.5.7.2 Lesión dopaminérgica inducida por MPTP

El MPTP (Figura 34B) es una de las neurotoxinas más utilizadas para generar modelos animales de EP. Tras su descubrimiento en un grupo de toxicómanos de San Francisco, se ha estudiado ampliamente el mecanismo de acción por el cual causa la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas. El MPTP es un compuesto lipofílico que atraviesa la barrera hematoencefálica con facilidad. Una vez en el SNC, el MPTP es oxidado en células gliales a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP⁺) en una reacción catalizada por la enzima MAO-B. Tras la oxidación, el MPDP⁺ se convierte espontáneamente en MPP⁺, que es el compuesto activo tóxico. El MPP⁺ es una molécula polar y no puede atravesar la membrana plasmática, por lo que necesita un transportador para entrar o salir de las células. El mecanismo por el cual el MPP⁺ es transportado desde la célula glial al espacio extracelular es desconocido, pero en cambio sí se sabe que es captado por las neuronas dopaminérgicas a través del DAT (Blum *et al.* 2001). Una vez en el interior de la neurona, el MPP⁺ inhibe el complejo I de la

cadena respiratoria mitocondrial, impidiendo la fosforilación oxidativa, disminuyendo el contenido de ATP de la célula y estimulando la producción de ROS (Figura 35) (Dauer *et al.* 2003, Betarbet *et al.* 2002, Sedelis *et al.* 2000, Singer *et al.* 1988, Jakowec *et al.* 2004). El MPTP se ha utilizado para inducir la muerte de las neuronas dopaminérgicas en distintas especies animales, como gatos, ratones o primates.

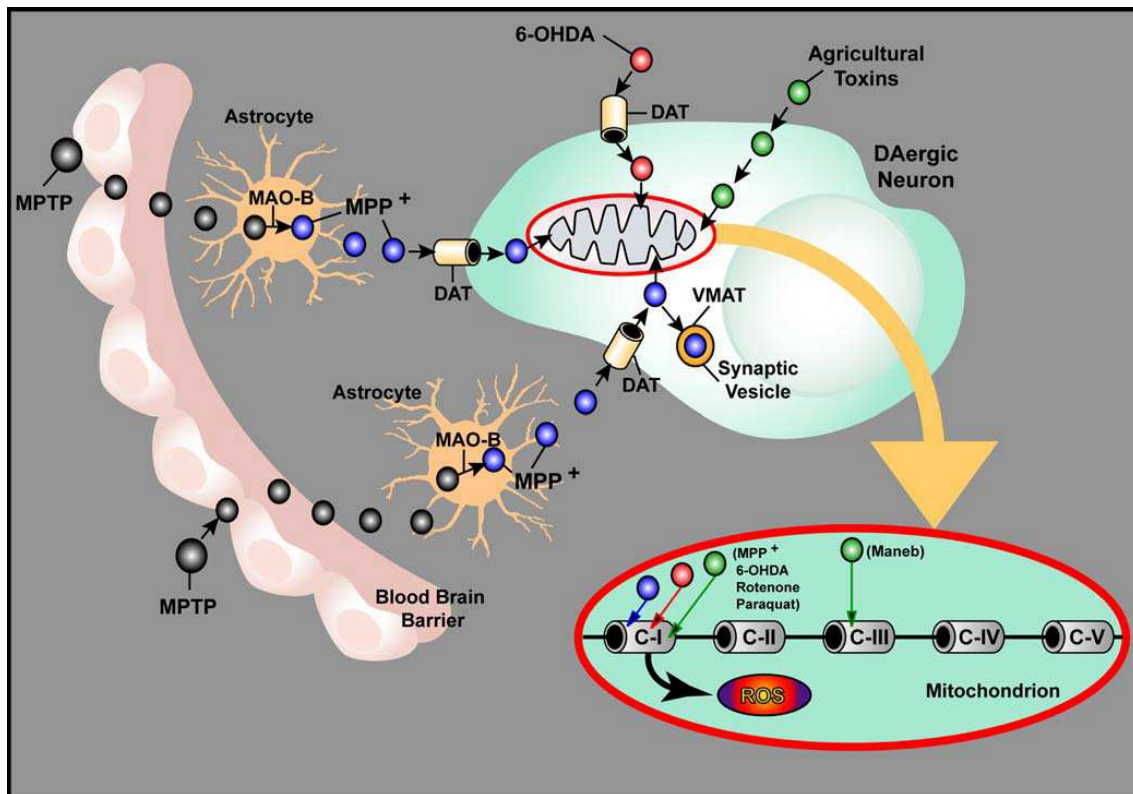


Figura 35. Mecanismos de acción de las toxinas usadas para la inducción de síntomas parkinsonianos en los diferentes modelos animales. (Extraído de Schober 2004)

1.6 EFECTOS DE LA COCAÍNA MEDIADOS POR LOS RECEPTORES DE DOPAMINA D₁ Y D₂

La cocaína es un extracto purificado de la planta de coca, *Erythroxylum coca*, procedente originariamente de América del sur (Figura 36). Las hojas de coca han formado parte de las culturas Inca, Ayamara y Quechua durante siglos. Para conseguir los efectos estimulantes, de euforia y eliminación del apetito, las hojas de coca eran masticadas. Originariamente, la coca era administrada, exclusivamente, en forma de hoja hasta que en 1860, Albert Neiman aisló un extracto de la hoja de coca, la cocaína. Su utilización se extendió rápidamente por todo el mundo y hoy en día su posesión, cultivo y distribución son ilegales, exceptuando requisitos médicos o normas gubernamentales; sin embargo, su uso está ampliamente extendido. Actualmente, la adicción a cocaína es un problema social y resulta complicado encontrar un buen tratamiento debido al alto grado de recaída que presenta el consumo de esta sustancia.

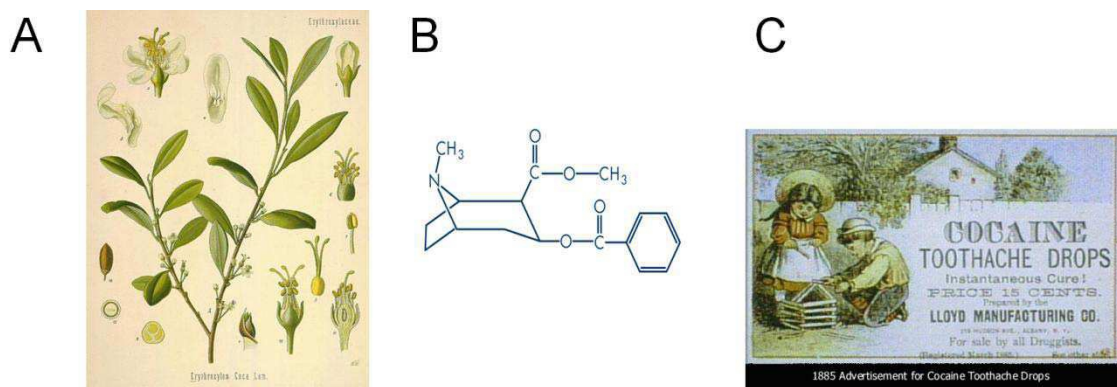


Figura 36. Cocaína. A) La planta *Erythroxylum coca* contiene cocaína en sus hojas B) Estructura molecular del $[1R-(exo,exo)]-3-(benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-2-carboxylic\ acid\ methyl\ ester$, también conocida como cocaína. C) Anuncio de unas gotas para el dolor de muelas, que contenían cocaína (1885)

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

sináptico, lo que causa una sobreestimulación de las vías dopaminérgicas (Figura 37). Los picos de dopamina pueden aparecer a los cinco minutos y no recuperarse los niveles basales hasta los treinta minutos (Bradberry 2000). Además, la vida media de la cocaína en rata es corta, puede oscilar entre quince minutos y una hora dependiendo de la vía de administración utilizada (Nayak *et al.* 1976) y se cree que una administración repetitiva podría prolongar los altos niveles de dopamina en el espacio sináptico y la vida media de esta sustancia (Volkow *et al.* 1999). Se considera que la hidrólisis del éster de cocaína es la principal ruta de su catabolismo.

Analizando los efectos de la cocaína desde una perspectiva morfológica, Roberts y colaboradores describieron una inhibición en los efectos de recompensa de la cocaína en ratas con el núcleo *accumbens* lesionado (Roberts *et al.* 1977). Posteriormente, en estudios de ratas adictas a la cocaína, se escogió el córtex prefrontal como región implicada en la autoadministración de microinyecciones de cocaína (Goeders y Smith 1983). Por otro lado las vías nigroestriatales controlan gran variedad de funciones motoras, además de contener la concentración más elevada de neuronas dopaminérgicas. Estos datos convierten al córtex prefrontal y las vías nigroestriatales en las regiones más importantes en la integración de los efectos de la cocaína, aunque no son las únicas (Bardo 1998). El consumo de cocaína aumenta los niveles de dopamina en el estriado, principalmente en la parte ventral, y más concretamente en el núcleo *accumbens*, el cual ha sido descrito como parte anatómica preferencial en mecanismos de recompensa (Koob 2006; Di Chiara y Bassareo 2007). La cocaína hace uso del sistema dopaminérgico para generar parte de sus efectos celulares y de comportamiento (De Mei *et al.* 2009). En ratas, la *shell* del núcleo *accumbens* es requerida para la adquisición inicial de la conducta de autoadministración de cocaína mientras que es el *core* el que se encarga de la adquisición de la conducta de búsqueda condicionada a estímulos asociados a dicha droga (Ito *et al.* 2004). Del mismo modo, una vez que los estímulos de recompensa asociados a cocaína están consolidados, es el estriado dorsal el que juega un papel central (Everitt y Robbins 2005). Es decir, se hipotetiza que se pasa progresivamente de una búsqueda motivada por una recompensa (conducta dependiente del núcleo *accumbens*) a hábitos estímulo-respuesta que dependen del estriado dorsal.

Un hipotético mecanismo de los cambios de comportamiento consecuentes a la administración crónica de cocaína es una alteración de la plasticidad sináptica del

cerebro. Hasta el momento, han sido descritos diferentes cambios en la estructura de las dendritas (Robinson y Kolb 1999; Robinson *et al.* 2001). Estos cambios podrían ser debidos a alteraciones en la expresión de las proteínas de los neurofilamentos, las proteínas del citoesqueleto y/o las *gap junctions*, todas ellas muy importantes para la estabilidad y la buena integración de los receptores en la sinapsis neuronal.

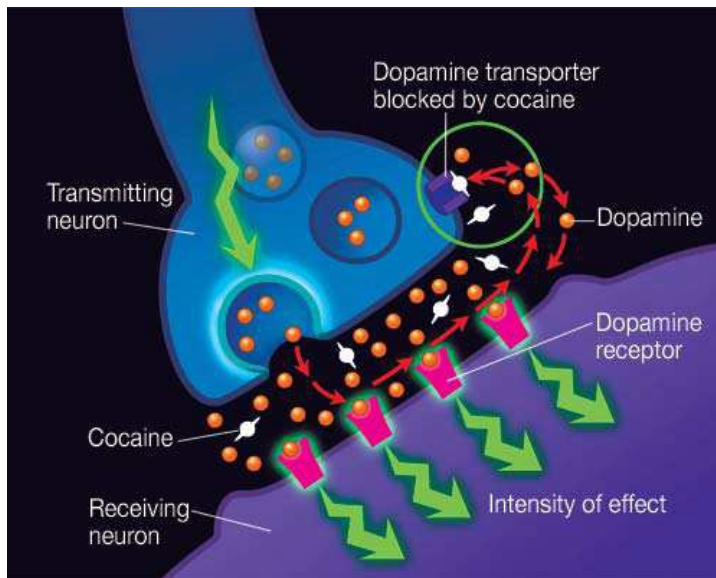


Figura 37. Efecto del bloqueo de los transportadores de dopamina (DAT) por la cocaína (extraído del artículo *Stimulant Addiction del Nacional Institute on Drug Abuse (NIDA)*)

1.6.1 Proteínas de unión de la cocaína

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

En el centro de interacción de la cocaína con DAT intervienen las hélices transmembrana 1, 3, 6 y 8 del transportador. Este centro de unión se superpone con el sitio de unión de la dopamina y las anfetaminas, pero es claramente diferente del lugar de unión de distintos antidepresivos (Beuming *et al.* 2008). Este hecho explica el bloqueo de la unión de la dopamina a DAT inducido por la cocaína y,

consecuentemente, el incremento en los niveles de dopamina en el espacio extracelular (Figura 38).

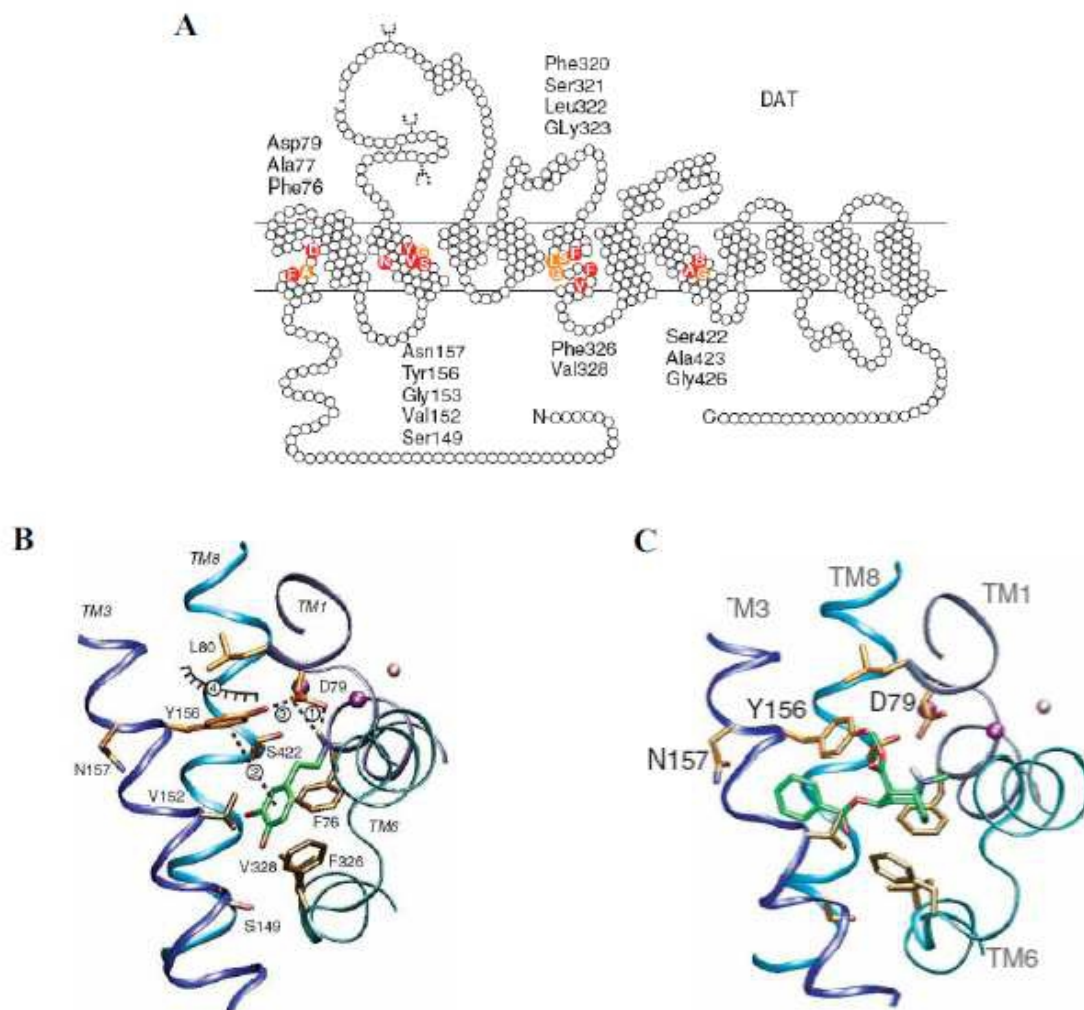


Figura 38. Esquema de la interacción de la cocaína y la dopamina con DAT. A) Representación del transportador de dopamina, DAT. Los círculos pintados corresponden a los lugares donde coincide la interacción de DAT con la dopamina y la cocaína. B) Esquema de la interacción de DAT con la dopamina. C) Esquema de la interacción de DAT con la cocaína (extraído de Bertolino *et al.* 2009)

Mediante estudios *in vitro* (Bertolino *et al.* 2009) e *in vivo* (Meiergerd *et al.* 1993; Dickinson *et al.* 1999; Mortensen y Amara 2003), se ha podido demostrar que existe una relación directa entre DAT y el receptor D₂ de dopamina ya que ambos se regulan de forma recíproca a nivel presináptico. Bertolino y colaboradores han demostrado que se produce una interacción molecular entre DAT y los receptores D₂ (Bertolino *et al.* 2009). Esta interacción puede ser fundamental para entender como la señalización de la dopamina se ve claramente regulada, a nivel presináptico, por DAT y por el receptor de dopamina D₂ en el estriado y en el córtex prefrontal.

Además de DAT, la cocaína puede interactuar con otras proteínas. Hoy en día es un hecho aceptado que la cocaína interactúa con los receptores sigma a concentraciones fisiológicas (Cobos *et al.* 2008). Esta familia de proteínas está formada por los **receptores sigma-1** y sigma-2. La cocaína es la droga de abuso mas estudiada con referencia a su interacción con los receptores sigma-1 (Hayashi y Su 2005). Una de las razones es que la cocaína posee una afinidad moderada por sigma-1 en ensayos de unión de radioligando (Sharkey *et al.* 1988; Matsumoto *et al.* 2003). Matsumoto y colaboradores describieron que los antagonistas del receptor sigma inhiben de forma significativa las convulsiones y la letalidad inducidas por dosis tóxicas de cocaína (Matsumoto *et al.* 2002, Matsumoto *et al.* 2004). La toxicidad de la cocaína se ve potenciada con los agonistas del receptor sigma-1 (Matsumoto *et al.* 2002, Matsumoto *et al.* 2004). Este descubrimiento indica que las acciones de la cocaína, al menos en parte, pueden ser mediadas por su unión al receptor sigma-1. La estructura del receptor sigma-2 aún no se conoce. Por otro lado, la estructura de sigma-1 es muy distinta de la de cualquier otra proteína conocida de mamíferos. Aunque muestra un 66% de homología con una esteroles isomerasa fúngica, carece de su actividad enzimática (Su y Hayashi 2003). Se caracteriza por poseer tres regiones altamente hidrofóbicas que formarían dos segmentos transmembrana con los extremos amino y carboxilo terminales en el espacio intracelular (Figura 39).



Figura 39. Esquema de la estructura del receptor sigma-1 (extraído de Steve Beyer's blog 2009)

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

2000). Se encuentra ampliamente distribuido por todo el SNC y la periferia. En 1976 fue clasificado como receptor opioide (Martin *et al.* 1976); sin embargo, la acción de los ligandos de σ -1 no era bloqueada por los antagonistas opioides, naloxona y naltrexona, por lo que fue considerado como un receptor huérfano no opioide. El receptor sigma interacciona con diferentes sustancias, además de la cocaína, entre las que destacan el haloperidol o los esteroides como la progesterona (Hayashi y Su 2003).

Muy recientemente se ha descubierto un alucinógeno endógeno que interacciona con el receptor sigma-1, el DMT (*N,N dimethyltryptamine*). Esta sustancia actuaría como agonista endógeno del receptor inhibiendo los canales de Na^+ dependientes de voltaje en los miocitos (Guitart *et al.* 2004; Fontanilla *et al.* 2009). El receptor sigma-1 también está implicado en la modulación de la liberación de calcio, la modulación de la contracción cardiaca y la inhibición de los canales de K^+ dependientes de voltaje (Monassier y Bousquet 2002). En 2001 Hayashi describió la interacción del receptor sigma-1 con los receptores IP_3 en el retículo endoplasmático (Hayashi y Su 2001). Más adelante, se demostró que la activación del receptor sigma-1 mediante sus agonistas (PRE-084 o carbetapentane) fosforila la subunidad NR1 del receptor NMDA vía PKC y PKA aumentando su expresión y reforzando la inducción de dolor a través del receptor NMDA. Esta señal se veía reducida por el tratamiento con el antagonista específico del receptor sigma-1 (Kim *et al.* 2008). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna interacción de estos receptores con ningún GPCR, aunque existen numerosas evidencias de la amplificación de señales de GPCR mediante los receptores sigma-1. Actualmente, son considerados como receptores auxiliares o amplificadores de otras señales.

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

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

1.6.2 Implicación de los receptores de dopamina D₁ y D₂ en los efectos de la cocaína

A pesar de que se ha visto que la administración crónica de cocaína induce cambios en la expresión génica de muchos receptores como el receptor metabotrópico 5 de glutamato (mGluR₅) (Ghasemzadeh *et al.* 1999) o el receptor μ -opioide (Yuferov *et al.* 1999), estudios en humanos postmortem no indicaron ningún cambio en el ARNm de los receptores de dopamina D₁ o D₂ en individuos adictos a la cocaína con referencia a los controles (Little *et al.* 1993; Meador-Woodruff *et al.* 1993). Estos resultados han sido controvertidos ya que se ha demostrado una disminución de la expresión de los receptores D₁ y D₂ de dopamina en individuos adictos a la cocaína en comparación con individuos sanos mediante la técnica de PET (*Positrón Emisión Tomography*) (Martinez *et al.* 2004; Martinez *et al.* 2009; Tsukada *et al.* 1996). La variación de la expresión de receptores de dopamina inducida por cocaína puede variar mucho según la especie y la región del cerebro, ya que en ratas, después de cuatro semanas de autoadministración de cocaína, se observó un incremento del ARNm del receptor D₁ en el telencéfalo anterior y un incremento del ARNm de los receptores D₁ y D₂ en la región límbica (Laurier *et al.* 1994).

A parte de la modificación o no de la expresión de los receptores, la cocaína induce un incremento de la liberación de dopamina y una sobreestimulación de las vías dopaminérgicas (Anderson y Pierce 2005; De Mei *et al.* 2009). Mediante la potenciación de la transmisión dopaminérgica en el estriado, la cocaína induce los efectos de recompensa así como la aparición de nuevos estímulos (Volkow *et al.* 1995; Volkow y Swanson 2003; Zink *et al.* 2003). Navarro y colaboradores (Navarro *et al.* 2010a) han obtenido recientemente nuevos resultados que aportan una explicación molecular por la cual los heterómeros D₁R-sigma-1 desempeñan un papel importante en los efectos comportamentales de la cocaína. Estos resultados, proporcionan una nueva

perspectiva para entender las bases moleculares involucradas en la adicción a la cocaína.

Los receptores D₂ también están involucrados en la mediación de estos efectos de recompensa. Los agonistas del receptor D₂ reducen la autoadministración de cocaína, mientras los antagonistas incrementan este comportamiento. Estos resultados sugieren que el receptor D₂ actúe por un mecanismo *feed-back* para disminuir la autoadministración de cocaína (Corrigall y Coen 1991; Caine *et al.* 1999).

Los antagonistas glutamatérgicos y dopaminérgicos reducen la activación de la transcripción génica inducida por la cocaína (Konradi 1998; Valjent *et al.* 2005). La activación de los receptores de dopamina D₁ es un requerimiento imprescindible para la respuesta celular y conductual inducida por la cocaína tal como se demuestra en estudios realizados con ratones *KO* para el receptor D₁ (Xu *et al.* 1994). Estudios recientes utilizando ratones transgénicos, donde las células que expresan los receptores D₁ y D₂ se encuentran marcadas mediante proteínas fluorescentes, han confirmado estos datos, mostrando que la respuesta celular aguda inducida por la cocaína involucra principalmente las neuronas que expresan los receptores D₁ de dopamina (Bertran-Gonzalez *et al.* 2008). En este escenario cabría esperar que una inhibición de la expresión génica del receptor D_{2S} amplificaría los efectos de la cocaína *in vivo*, debido a la inhibición ejercida por el receptor D_{2S} de la liberación de dopamina. Sin embargo, no es esto lo que se observa. El efecto de la cocaína en ratones *KO* para receptores D₂ ha sido estudiado tanto en tratamientos agudos, crónicos como en autoadministración de cocaína, con el resultado que los ratones *KO* para D₂ tienen alteradas las respuestas a cocaína. Así, la estimulación de la actividad motora inducida por cocaína en los ratones *KO* para receptores D₂ no incrementa de forma dosis-dependiente (Chausmer *et al.* 2002; Welter *et al.* 2007). De forma sorprendente, la administración de cocaína en los ratones *KO* para D₂ no induce la expresión de *c-fos* (Centonze *et al.* 2002). Esto conduce a hipotetizar que en ausencia del receptor D₂, aparece un circuito inhibitorio, normalmente controlado por los receptores D₂, provocando la supresión de la inducción de *c-fos*. En este contexto, el GABA y la acetilcolina pueden aumentar de forma considerable debido a la pérdida del control de su liberación por el receptor D₂ y jugar un papel en el bloqueo de la inducción de *c-fos* (Centonze *et al.* 2002). De forma alternativa, la pérdida de los receptores D₂ afecta la formación de complejos

macromoleculares entre los receptores D₂ y otras proteínas que normalmente controlan la respuesta celular y conductual de la cocaína (Liu *et al.* 2006).

Los efectos de recompensa de la cocaína en los ratones *KO* para receptores D₂ se ven atenuados (Welter *et al.* 2007). Sin embargo, estudios de autoadministración de cocaína en ratones *KO* para el receptor D₂ demostraron que los ratones *KO* se autoadministraban más cocaína que los ratones WT (Caine *et al.* 2002). No puede excluirse la contribución de otros neuromoduladores (como por ejemplo la noradrenalina o la serotonina) y se requiere un análisis más profundo para esclarecer este fenómeno. Este punto es importante debido a la existencia de numerosos estudios que muestran una pérdida de los efectos de recompensa de diferentes drogas de abuso en ratones *KO* para receptores D₂. (Risinger *et al.* 2000; Elmer *et al.* 2005).

Por otro lado, los ratones *KO* para D_{2L}, que por lo tanto siguen expresando los autoreceptores D_{2S}, mantienen la respuesta locomotora y de recompensa a la cocaína parecida a los animales WT (Usiello *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Rouge-Pont *et al.* 2002). Así, parece ser que el receptor D_{2S} es el principal implicado en la respuesta celular y conductual de las drogas de abuso. Esto sugiere que los efectos presinápticos de los receptores D₂ no involucran únicamente la liberación de dopamina, sino también de GABA, glutamato y acetilcolina en respuesta a las drogas de abuso. Así, existe una diferente implicación de las isoformas D_{2S} y D_{2L} en la señalización dopaminérgica inducida por drogas de abuso. La ausencia de la señalización del receptor D_{2L} no altera los efectos motores y de recompensa inducidos por la cocaína. Contrariamente, la señalización del receptor D_{2S} parece ser un requisito imprescindible para los efectos motores y de recompensa de la cocaína y otras drogas de abuso. De todos modos, se requieren más estudios para poder decidir que componente presináptico se encuentra involucrado en estas respuestas y si se encuentra en las neuronas dopaminérgicas o en las neuronas postsinápticas.

No se han observado cambios significativos en los niveles de expresión del receptor D₂ en el estriado dorsal en animales con diez días de alto consumo de cocaína (Marcellino *et al.* 2007). Este es un descubrimiento importante que indica que cambios en la expresión de los receptores D₂ en esta zona del cerebro no están involucrados en la adaptación de la respuesta a los efectos de recompensa de la cocaína en este modelo.

Recientemente, cambios bifásicos en los receptores D₂ en el *core* del núcleo *accumbens* han sido observados después de una retirada de pocos días de acceso a cocaína intravenosa (Ben-Shahar *et al.* 2007). Parece ser, que la dosis y la exposición a la cocaína son las responsables de estas diferencias. La autoadministración crónica de cocaína en monos *rhesus* por periodos de varios meses provoca una disminución de la densidad del receptor D₂ en el estriado detectada por autoradiografía (Moore *et al.* 1998; Nader *et al.* 2002). Mediante estudios de imágenes se ha podido detectar una disminución en la cantidad de receptores D₂ en humanos adictos a la cocaína comparado con los sujetos controles (Volkow *et al.* 1993; Martínez *et al.* 2004). De forma similar, mediante la técnica de PET se ha observado una reducción en los receptores D₂ en primates con autoadministración crónica de cocaína y un año de abstinencia (Morgan *et al.* 2002a; Morgan *et al.* 2002b; Nader *et al.* 2006). Una persistente disminución de los receptores D₂ en el estriado puede involucrar la internalización de los receptores D₂ después de una autoadministración crónica de cocaína.

Todos estos estudios, nos llevan a pensar en la existencia de un delicado balance entre la acción de los receptores D₁ y D₂ en el cerebro, que está controlando tanto los procesos motivacionales como los de refuerzo en y durante el consumo de las drogas, y especialmente en el caso de la cocaína.

1.7 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El cannabis, comúnmente conocido como “marihuana”, es una de las drogas de abuso más extendidas entre la población europea. Su uso intensivo se ha relacionado con diversos problemas neurológicos no específicos. En contrapunto, el sistema endocannabinoide, descubierto a partir de la identificación de las sustancias psicoactivas del cannabis, se ha puesto en el punto de mira de la sociedad en los últimos años como posible diana terapéutica para muchas enfermedades de tipo neurodegenerativo y tumoral. Si bien los efectos y propiedades terapéuticas del cannabis ya eran harto conocidos por antiguas civilizaciones, no fue hasta 1964 que se consiguió aislar el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), principal constituyente psicoactivo del cannabis, a partir de preparaciones de *Cannabis Sativa* (Mechoulam y Gaoni 1965; Gaoni y Mechoulam 1971) que, aún a día de hoy, se utiliza para combatir la emesis y la falta de apetito en los enfermos de cáncer. El carácter lipofílico de esta sustancia hacía pensar que ejercía sus efectos de manera inespecífica, interaccionando con los lípidos de la membrana celular. Sin embargo, unos veinte años más tarde, Howlett y colaboradores (Howlett et al. 1990) describieron centros de unión de alta afinidad para el Δ^9 -THC en membranas celulares, lo que sugirió que su acción podía estar mediada por receptores específicos. Hasta ahora, se han clonado y caracterizado inequívocamente dos de estos receptores: los receptores CB₁ y los receptores CB₂ (Figura 40). El primer receptor de esta familia, el CB₁, se encontró a partir de un *screening* de GPCR huérfanos (Matsuda et al. 1990) y su localización fue predominantemente cerebral y testicular. El descubrimiento del segundo receptor, el CB₂, fue posterior e, inicialmente, su localización se restringió a la periferia, principalmente en el sistema inmune (Pertwee 1997). Hoy en día se sabe que, si bien es cierta su expresión predominante en células inmunológicas, los receptores CB₂ aparecen también en el sistema nervioso central y su acción es clave para entender ciertas enfermedades cerebrales, al mismo tiempo que suponen una diana terapéutica clave en su tratamiento (Rivers y Ashton 2010). Si bien persiste la idea de que los receptores CB₁, por su abundancia y ubicuidad, son la principal diana de acción de los cannabinoides en el sistema nervioso central, existen evidencias de que no todas las acciones de los cannabinoides son mediadas por este receptor y que, probablemente, algunas puedan ser atribuidas a los CB₂, o incluso otro tipo de receptores capaces de mediar los efectos neuronales de los cannabinoides como

el receptor huérfano GPR55 (Ryberg *et al.* 2007; Pertwee 2007; Sharir y Abood 2010; Martínez-Pinilla *et al.* 2014).

La identificación, caracterización y localización de receptores específicos, capaces de reconocer al Δ^9 -THC, planteó la cuestión de cuál o cuáles debían ser los ligandos endógenos capaces de interactuar con estos receptores, es decir, la posible existencia endógena de sustancias similares al Δ^9 -THC que, actuando a modo de agonistas, mimetizaran sus efectos en el organismo. Aunque en los últimos años han sido numerosos los endocannabinoides aislados, tanto de tejido nervioso como periférico, los más importantes son los derivados de eicosanoides como la anandamida (AEA) (Devane *et al.* 1992) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam *et al.* 1995). A partir de su identificación, se investigó la ruta bioquímica de su síntesis, liberación (Di Marzo *et al.* 1994; Cadas *et al.* 1996), transporte (Beltramo *et al.* 1997) y degradación (Cravatt *et al.* 1996). Todo ello permitió denominar con el término de “sistema endocannabinoide” a un conjunto de componentes que comprende: i) Los receptores de cannabinoides, ii) los ligandos endógenos o endocannabinoides y iii) los enzimas implicados en su síntesis y degradación. En la actualidad, este sistema aparece como un relevante modulador fisiológico, no sólo a nivel del sistema nervioso central, sino también en el periférico y en otros muchos sistemas del organismo.

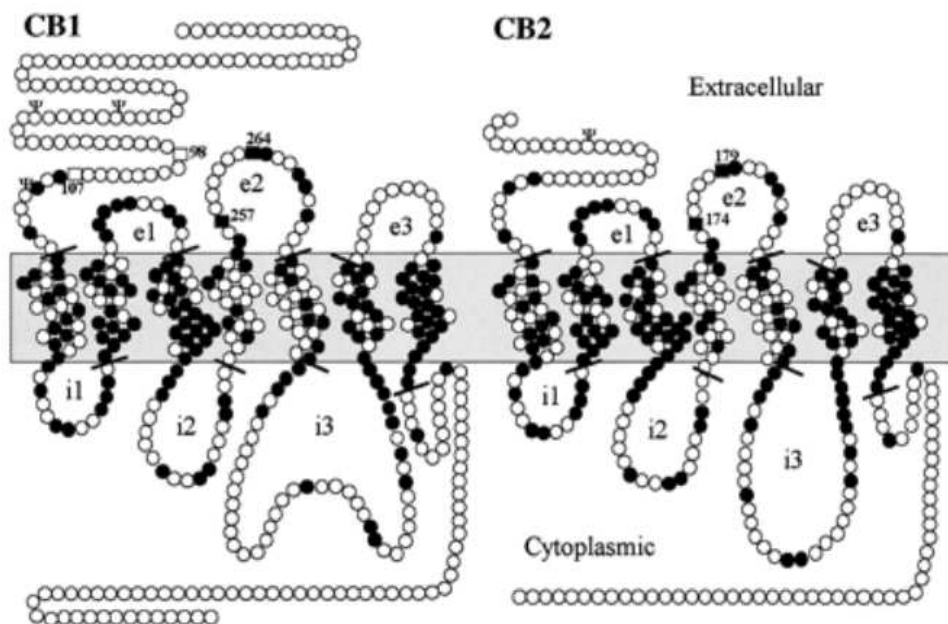


Figura 40. Estructura de los receptores CB₁ y CB₂. En negro se representan los aminoácidos comunes en ambos receptores, y los lugares de glicosilación están marcados con el símbolo Ψ (extraído de Shire *et al.* 1996)

1.7.1 Receptor de cannabinoides CB₁

El cDNA de los receptores CB₁ fue aislado por primera vez de una librería de corteza cerebral de rata. El locus del gen en humanos se ha localizado en el cromosoma 6 en la posición 6q14-q15 (Caenazzo *et al.* 1991; Hoehe *et al.* 1991). La proteína codificada posee una alta homología en nucleótidos y aminoácidos entre humanos y roedores. Pertenece a la familia A de los GPCR, aunque difiere de los receptores de este grupo en que no presenta el puente disulfuro en el EC2 ni el residuo de prolina en el TM-5. Puede presentar hasta tres lugares de glicosilación, de tal manera que su peso puede variar hasta en 10kDa.

Como GPCR, los receptores CB₁ se pueden unir tanto a proteína G_i como G_o a través del extremo carboxi-terminal intracelular. Los aminoácidos más próximos a la membrana de esta región son decisivos para el acoplamiento de la proteína G_{i/o}, mientras que los más distales modulan la amplitud y la cinética (Nie y Lewis 2001a; b). La cola C-terminal está implicada, también, en procesos de desensibilización e internalización. De esta manera, los aminoácidos de la zona central del extremo carboxi-terminal contienen residuos fosforilados necesarios para la desensibilización mediada por quinasas específicas (GRK) y arrestinas (Jin *et al.* 1999), mientras que cuatro residuos del final de la cola son importantes en la internalización (Hsieh *et al.* 1999). La unión a la proteína G de estos receptores en los terminales presinápticos da lugar a una inhibición de la adenilato ciclasa, disminuyendo así la producción de AMPc; si bien esto puede variar en función del receptor con el que heteromerice. Así pues, se observó que, en presencia de los receptores de dopamina D₂, los receptores CB₁ se unen a la proteína Gs estimulando la producción de AMPc (Kearn *et al.* 2005).

Los receptores CB₁ están implicados, además, en otras vías de señalización, dependiendo de las células en las que se encuentren, estimulando a las quinasas activadoras de mitógenos (MAPK) tales como ERK 1/2, p38 y c-Jun (JNK), la vía de PI3K/Akt, además de la expresión de genes tempranos (ej. Krox-24) (Turu y Hunyady 2010). La desensibilización del receptor CB₁ se ha descrito que está mediada por un mecanismo de internalización a través de la acción de β-arrestinas (Breivogel *et al.* 2008; Daigle *et al.* 2008). Todos estos mecanismos de señalización pueden mediar los efectos de los cannabinoides como reguladores de la liberación de neurotransmisores. De

esta manera, los endocannabinoides funcionan como mensajeros retrógrados cuando sus receptores diana se encuentran en la membrana presináptica, inhibiendo la liberación de glutamato (Shen *et al.* 1996), GABA (Szabo *et al.* 1998), acetilcolina (Gifford *et al.* 1997), noradrenalina (Schlicker *et al.* 1997a) y serotonina (Nakazi *et al.* 2000).

El sistema cannabinoide es especialmente relevante en las funciones cognitivas y emocionales; está implicado en circuitos neuronales de la corteza, hipocampo y amígdala y en la adicción a drogas en el sistema mesolímbico mediante mecanismos de modulación sináptica que incluyen DSI (*Depolarization-Induced Supression of Inhibition*), en neuronas GABAérgicas, y DSE (*Depolarization-Induced Supression of Excitation*), en neuronas glutamatérgicas (Parolaro y Rubino 2002; Gerdeman y Lovinger 2003; Laviolette y Grace 2006). Aunque la activación presináptica de los CB₁R casi siempre conlleva una disminución en la liberación del neurotransmisor (Freund *et al.* 2003a), la magnitud de su acción se puede dividir en dos mecanismos diferentes con respecto a su potencia y su implicación patofisiológica: la depresión a corto plazo o *short-term depression* (STD) y la depresión a largo plazo o *long-term depression* (LTD). Mientras la primera es de corta duración (menos de un segundo) y rápida aparición, la segunda, por estimulación prolongada de los receptores de CB₁, es de aparición más tardía y suele durar varias horas (Katona y Freund 2008; Sidhpura y Parsons 2011).

Los receptores CB₁ son unos de los receptores neuronales más abundantes en el cerebro de mamíferos. De hecho, son considerados los GPCR más abundantes del CNS. La distribución regional de los CB₁ ha sido caracterizada en el cerebro humano y de rata en correlación con los efectos de los cannabinooides en el comportamiento como el humor, la coordinación motora, funciones autonómicas, aprendizaje y memoria, percepción sensorial y mecanismos del dolor, entre otros (Glass *et al.* 1997b; Westlake *et al.* 1994; Valverde 2005).

En cuanto a la distribución en el sistema nervioso, los receptores CB₁ se encuentran en alta densidad, tanto en sinápsis glutamatérgicas como gabaérgicas, en hipocampo, amígdala, hipotálamo, algunas regiones olfatorias, en interneuronas o neuronas de proyección de los ganglios basales: caudado-putamen (estriado dorsal),

núcleo *accumbens* (estriado ventral), sustancia *nigra pars reticulata* (SNr) y globo pálido; en cerebelo y médula espinal. De forma más moderada se pueden encontrar también en corteza y tálamo (Mailleux y Vanderhaeghen 1992; Westlake *et al.* 1994; Glass *et al.* 1997a; Farquhar-Smith *et al.* 2000; Svízenská *et al.* 2008) (Figura 41).

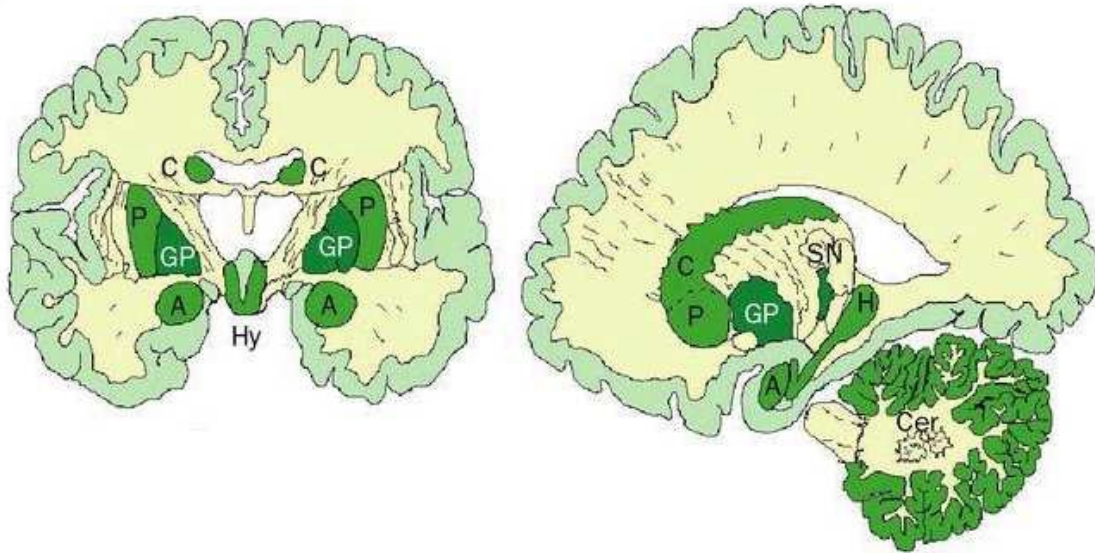


Figura 41. Distribución de los receptores CB₁ en el sistema nervioso de mamíferos. La concentración del receptor de cannabinoides es mayor (verde intenso) en globo pálido (GP), y sustancia negra (SN): alta pero algo menor en cerebelo (Cer), hipocampo (H), núcleo caudado ©, putamen (P), hipotálamo (Hy), y amígdala (Am): moderada en la corteza y baja en la sustancia blanca (amarillo) (extraído de Baker *et al.* 2003)

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

La dopamina desarrolla un papel muy importante en la regulación del funcionamiento de los ganglios basales. La transmisión dopaminérgica está involucrada en actividades neuronales claves, como el control de la locomoción, la adicción, el conocimiento, el aprendizaje o las funciones de memoria. La desregulación de este sistema da lugar a diferentes patologías como son la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia. La dopamina actúa por interacción con los receptores de dopamina de las familias *D₁-like* (receptores D₁ y D₅) y *D₂-like* (receptores D₂, D₃ y D₄) que están acoplados a proteína G. Los receptores de dopamina sabemos que interaccionan con receptores tanto de la misma familia (entre otros, los de dopamina D₁ con los D₃) como con otros tipos de receptores (los de dopamina D₂ con los de adenosina A_{2A}, cannabinoides CB₁ o sigma-1, por ejemplo), para formar complejos heteroméricos altamente organizados donde la actividad y funcionalidad de cada miembro puede ser finamente modulada. Los receptores D₁ y D₂ han estado el principal objetivo de estudio en esta Tesis así como también conocer algunos mecanismos por los cuales otros receptores o moduladores alostéricos pueden modificar las propiedades farmacológicas de estos dos receptores de dopamina.

El efecto antagónico entre la adenosina y la dopamina ha sido propuesto como una vía para tratar los pacientes de Parkinson y minimizar los efectos negativos del tratamiento con L-DOPA. También que se ha visto que los receptores de cannabinoides pueden intervenir y alterar las propiedades farmacológicas del complejo heteromérico descubierto en nuestro grupo, formado por los receptores A_{2A} – D₂ – CB₁. Aún así, poco se sabe acerca de estos heterómeros a medida que evoluciona la enfermedad o con el tratamiento de L-DOPA, es por eso, que el primer objetivo de esta Tesis ha sido:

Objetivo 1. Determinar los cambios en la expresión, la farmacología y la heteromerización de los receptores D₂ de dopamina, A_{2A} de adenosina y CB₁ de cannabinoides en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, en diferentes estados de progresión.

Dada la importancia de estudiar los GPCR implicados en la Enfermedad de Parkinson, quisimos investigar más a fondo las interacciones con otras proteínas que pueden modular la actividad de dos de los receptores que forman parte del heterotrímero A_{2A} – D₂ – CB₁ y que tienen un papel importante en la vía indirecta del movimiento de

los ganglios basales, la vía que está sobre-activada en la patología. Se trata, por una parte, el receptor de adenosina A_{2A} y por otra, el receptor de dopamina D_2 , que sabíamos que son moduladores alostéricamente por otras proteínas, a partir de diferentes hallazgos descubiertos inicialmente en el grupo de investigación donde se ha desarrollado la Tesis.

La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima del metabolismo purínico es capaz de degradar adenosina con lo que regula la cantidad de hormona extracelular que se une a los receptores y mediante su interacción con éstos es capaz de potenciar la unión de los ligandos a los receptores A_1 , A_{2A} , independientemente de su actividad catalítica. A pesar de ello, al iniciarse esta Tesis no se conocían las regiones del enzima responsables de modular tanto su actividad catalítica como la modulación sobre la unión de ligandos a estos receptores de adenosina, por lo que el segundo objetivo de esta Tesis ha sido:

Objetivo 2. Identificar los dominios estructurales implicados en la interacción de la ADA con los receptores A_1 y A_{2A} , y en la modulación de su actividad catalítica.

Las vías dopaminérgicas y especialmente la señalización mediada por los receptores D_1 y D_2 de dopamina, están profundamente implicadas en la adicción a cocaína. Una gran parte de los efectos mediados por la cocaína se atribuyen a una sobre-estimulación de la señalización de los receptores de dopamina debida al incremento de dopamina ocasionado por la inhibición por cocaína del transportador de dopamina (DAT). Sin embargo, la cocaína, además de interactuar con DAT, puede unirse a otras proteínas como los receptores sigma-1. Una vez estudiada la importancia de la heteromerización entre sigma-1 y D_1 en los efectos comportamentales de la cocaína, en nuestro grupo, consideramos interesante conocer si los receptores sigma-1 también pueden modular la funcionalidad de los receptores de dopamina D_2 mediante un proceso de heteromerización, por lo que el tercer objetivo de esta Tesis fue:

Objetivo 3. Estudiar si los receptores D_2 de dopamina pueden formar heterómeros con los receptores sigma-1 e investigar el efecto que ejerce la cocaína, mediado por estos heterómeros, en la transmisión dopaminérgica.

El tratamiento paliativo de la enfermedad de Parkinson es suministrar un precursor de dopamina, la L-DOPA, que aunque es efectivo en los primeros estadios de la enfermedad, acaba por perder la efectividad y provoca la aparición de complicaciones motoras como las discinesias inducidas por levodopa (DIL). El tratamiento pulsátil con L-DOPA exagera más la supersensibilidad de los receptores D₁ de dopamina y es la causa de los cambios en la expresión de genes y proteínas estriatales que establecen y mantienen un estado propenso a la aparición de las discinesias. Aunque la causa molecular de las DIL no está del todo clara, diferentes trabajos han mostrado el receptor de dopamina D₃ como una diana prometedoras en las DIL, ya que se encuentra sobreexpresado en los ganglios basales de los modelos de DIL de roedores y primates no humanos. El receptor D₃ tiene una expresión relativamente baja en el estriado y podría, de hecho, mediar la mayoría de las interacciones de los receptores de las familias D₁,D₂-like en las neuronas estriatales. En el pasado, nuestro grupo evidenció la existencia de interacciones a nivel molecular entre los receptores D₁ y D₃ en células co-transfectadas y tejido estriatal bovino, mostrando al receptor D₃ como un potenciador de la estimulación de D₁ a nivel neuronal y comportamental. Así, el receptor D₃ es considerado como una diana prometedoras para las complicaciones motoras asociadas al tratamiento de la patología del Parkinson, por lo que el cuarto y último objetivo es:

Objetivo 4. Determinar la existencia de heterómeros D₁-D₃ y demostrar el papel importante del heterómero en la etiología de las discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA, empleando modelos animales de la enfermedad de Parkinson.

RESULTADOS



3. RESULTADOS

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

- 3.1** Eduard Gracia*, **Daniel Farré***, Antoni Cortés, Carles Ferrer-Costa, Modesto Orozco, Josefa Mallol, Carme Lluís, Enric I. Canela, Peter McCormick, Rafael Franco, Francesca Fanelli, Vicent Casadó. **The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors.**

FASEB J. 2013 Mar; 27(3): 1048-1061

- 3.2** Gemma Navarro, Estefanía Moreno, Jordi Bonaventura, Marc Brugarolas, **Daniel Farré**, David Aguinaga, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Carme Lluís, Sergi Ferre, Rafael Franco*, Enric I. Canela*, Peter J. McCormick*. **Cocaine inhibits dopamine D₂ receptor signaling via sigma-1-D₂ receptor heteromers.**

PLoS One. 2013 Apr 18 ; 8(4): e61245

- 3.3** Jordi Bonaventura*, Alberto J. Rico*, Estefanía Moreno, Salvador Sierra, Marta Sánchez, Natasha Luquin, **Daniel Farré**, Christa E. Müller, Eva Martínez-Pinilla, Antoni Cortés, Josefa Mallol, Marie-Therese Armentero, Annalisa Pinna, Enric I. Canela, Carme Lluís, Peter J. McCormick, José L. Lanciego, Vicent Casadó*, Rafael Franco*. **L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine–CB₁ cannabinoid–D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus.**

Neuropharmacology. 2013 Nov 11; 79C: 90-100.

- 3.4** Annalisa Pinna, Jordi Bonaventura, **Daniel Farré**, Marta Sánchez, Nicola Simola, Josefa Mallol, Carme Lluís, Giulia Costa, Younis Baqi, Christa E. Müller, Antoni Cortés, Peter J. McCormick, Enric I. Canela, Eva Martínez-Pinilla, José L. Lanciego, Vicent Casadó*, Marie-Therese Armentero*, Rafael Franco*. **L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁-dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies.**

Exp Neurol. 2014 Jan 9. Volume 253 (March 2014): 180–191

- 3.5** **Daniel Farré***, Ana M. Muñoz*, Estefanía Moreno*, Irene Reyes-Resina, Júlia Canet-Pons, Iria G. Dopeso-Reyes, Alberto J. Rico, Carme Lluís, Josefa Mallol, Gemma Navarro, Enric I. Canela, Antonio Cortés, José L. Labandeira-García, Vicent Casadó*, José L. Lanciego*, Rafael Franco*. **Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia.**

Manuscrito enviado para su publicación a Molecular Neurobiology

* Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

3.1 La puerta estructural del sitio catalítico de la adenosina desaminasa modula alostéricamente la unión de ligandos a los receptores de adenosina.

Eduard Gracia^{*†,1}, Daniel Farré^{*†,1}, Antoni Cortés^{*†}, Carles Ferrer-Costa[‡], Modesto Orozco^{‡,‡}, Josefa Mallol^{*†}, Carme Lluís^{*†}, Enric I. Canela^{*†}, Peter J. McCormick^{*†}, Rafael Franco[†], Francesca Fanelli[§], Vicent Casadó^{*†}

* Laboratorio of Neurobiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), España

† Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

‡ Joint Institute for Research in Biomedicine–Barcelona Supercomputing Center (IRB-BSC) Program on Computational Biology, Institute for Research in Biomedicine, España

§ Dulbecco Telethon Institute and Department of Chemistry, Modena, Italia

1 Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Manuscrito publicado en The FASEB Journal 2013 Mar; 27(3): 1048-1061

El enzima adenosina desaminasa (ADA) es una proteína multifuncional que puede tanto degradar la adenosina como unirse extracelularmente a los receptores de adenosina, y actúa como modulador alostérico regulando los efectos hormonales de la adenosina. Las regiones moleculares del ADA responsables de esta modulación son hasta ahora desconocidas. En este trabajo, mediante mutagénesis dirigida a alanina de diversos aminoácidos presentes en los cuatro segmentos de la secuencia de la ADA, deducidos a partir de técnicas de *docking*, se identificaron las regiones del enzima responsables de modular tanto su actividad catalítica como la modulación sobre la unión de ligandos a los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} . La combinación de experimentos computacionales e *in vitro* mostraron que la puerta estructural del sitio activo; por ejemplo, la hélice α -1 que contiene los residuos L58-I72 y el loop que contiene los residuos A184-I188 del ADA, fueron importantes para mantener tanto la eficiencia catalítica del enzima como su acción de modulador alostérico sobre los receptores de adenosina. Estos datos son consistentes con el ensamblaje supramolecular predicho, en el cual el ADA hace de puente entre los receptores de adenosina y CD26, y están de acuerdo con la idea de que la interacción del ADA con los receptores de adenosina tiene un papel importante en la inmunosinapsis. Además, proponemos que es la forma abierta del ADA, y no la cerrada, la responsable de interactuar funcionalmente con los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} .

The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors

Eduard Gracia,^{*,†,1} Daniel Farré,^{*,†,1} Antoni Cortés,^{*,†} Carles Ferrer-Costa,[‡] Modesto Orozco,^{†,‡} Josefa Mallol,^{*,†} Carme Lluís,^{*,†} Enric I. Canela,^{*,†} Peter J. McCormick,^{*,†} Rafael Franco,^{†,2} Francesca Fanelli,[§] and Vicent Casadó^{*,†,3}

*Laboratory of Molecular Neurobiology, Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and †Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ‡Joint Institute for Research in Biomedicine–Barcelona Computing Center (IRB-BSC) Program on Computational Biology, Institute for Research in Biomedicine, §Dulbecco Telethon Institute and Department of Chemistry, Modena, Italy

ABSTRACT The enzyme adenosine deaminase (ADA) is a multifunctional protein that can both degrade adenosine and bind extracellularly to adenosine receptors, acting as an allosteric modulator regulating the hormonal effects of adenosine. The molecular regions of ADA responsible for the latter are unknown. In this work, alanine scanning mutagenesis of various ADA amino acid stretches, selected through *in silico* docking experiments, allowed us to identify regions of the enzyme responsible for modulating both its catalytic activity and its ability to modulate agonist binding to A₁ and A_{2A} adenosine receptors (A₁R and A_{2A}R). The combination of computational and *in vitro* experiments show that the structural gate to the catalytic site; *i.e.*, the α -1 helix containing residues L58-I72 and the loop containing residues A184-I188 of ADA, were important to maintain both the catalytic efficiency of the enzyme and its action as an allosteric modulator of the adenosine receptors. These data are consistent with a predicted supramolecular assembly, in which ADA bridges A_{2A}R and CD26 and are in line with the notion that the interaction of ADA with adenosine receptors has an important role in the immunosynapse. We propose that it is the ADA open form, but not the closed one, that is responsible for the func-

tional interaction with A₁R and A_{2A}R.—Gracia, E., Farré, D., Cortés, A., Ferrer-Costa, C., Orozco, M., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E. I., McCormick, P. J., Franco, R., Fanelli, F., Casadó, V. The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J.* 27, 000–000 (2013). www.fasebj.org

Key Words: multifunctional proteins • protein-protein interaction • enzyme mutants • *in silico* docking • immunological synapse

ADENOSINE DEAMINASE 1 (ADA; EC 3.5.4.4) is a key enzyme in the purine pathway catalyzing the irreversible deamination of adenosine or 2'-deoxyadenosine to inosine or 2'-deoxyinosine and ammonia (1). In humans, ADA is encoded by the 32-kb *Ada* gene on chromosome 20q (2) and occurs as a soluble 41-kDa monomer with 363 aa in all tissues. Inherited ADA deficiency is a rare metabolic disorder that causes lymphopenia and immunodeficiency due to toxic effects of its substrates. Most patients are infants with severe combined immunodeficiency disease (SCID) but healthy individuals with “partial” ADA deficiency have also been identified (3, 4). ADA deficiency accounts for ~15% of all SCID cases and one-third of autosomal recessive SCID cases. More than 70 ADA mutations, including >30 amino acid substitutions, have been found in patients (5 and references therein).

Abbreviations: A₁R, adenosine receptor A₁; A_{2A}R, adenosine receptor A_{2A}; A_{2B}R, adenosine receptor A_{2B}; ADA, adenosine deaminase; AR, adenosine receptor; CGS21680, 3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxyoxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid; EL, extracellular loop; GPCR, G-protein-coupled receptor; HDPR, 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside; MD, molecular dynamics; NECA, *N*-ethyl-5'-carboxyamido-adenosine [(2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-yl)-*N*-ethyl-3,4-dihydroxyoxolane-2-carboxamide]; ODA, optimal desolvation area; (R)-PIA, *N*6-(2-phenylisopropyl)-adenosine [(2R,3S,4R,5R)-2-(hydroxymethyl)-5-[[[(2S)-1-phenylpropan-2-yl]amino]purin-9-yl]oxolane-3,4-diol]; SCID, severe combined immunodeficiency disease; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain.

³ Correspondence: Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: vcasado@ub.edu
doi: 10.1096/fj.12-212621

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

Due to the release of ADA to the extracellular medium and the ability of the enzyme to bind to the cell surface, ADA is also expressed as an ectoenzyme with relevant physiological roles in medullary thymocytes, activated T cells, and epithelial cells (6–8). The first identified cell surface ADA binding protein was CD26/dipeptidyl peptidase IV (6, 7). CD26 is a multifunctional transmembrane glycoprotein that is widely expressed in most cell types, including epithelial cells and T lymphocytes, on which it is a marker of activation (9). The interaction between CD26 and ADA seems to be critical for the regulation of adenosine signaling in the immune system, for antigen presentation at the immunological synapse, and for the regulation of T-cell proliferation (8, 10, 11). CD26 also plays an important role in tumor biology (12–15) and together with ecto-ADA is selectively expressed on ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma (16). Using human-mouse ADA hybrids and ADA point mutants, Richard and coworkers (17, 18) localized the amino acids of ADA critical for CD26 binding into the α -helical segment P126-D143. Later, Weihofen and coworkers (19) crystallized the complex of the human CD26 ectodomain with bovine ADA. The crystal structure shows the existence of two intermolecular contacts that contribute to and stabilize the CD26-ADA complex formation. The first class of interactions is established between the loop A (I287-D297) of CD26 and the region successive to the α -1 helix (R76-A91) of ADA. The second class of intermolecular regions are between the loop B (D331-Q344) of CD26 and α -2 helix (P126-D143) of ADA, the same α -helix previously reported by Richard and coworkers (17, 18) from mutagenic studies (see above).

The second type of ecto-ADA-binding proteins includes the adenosine receptors (ARs) A_1 (A_{1R} ; refs. 20–23), A_{2A} (A_{2AR} ; ref. 24), and A_{2B} (A_{2BR} ; ref. 25), which are members of the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Binding of enzymatically active or Hg^{2+} -inactivated ADA to A_{2BR} increases the receptor affinity and signaling through protein-protein interactions (25). The ADA- A_{1R} interaction is important because the enzyme potentiates signal transduction and modulates A_{1R} desensitization (20, 26). Very recently, we have shown that ADA binds to human A_{1R} and A_{2AR} , behaving as an allosteric effector that markedly enhances agonist affinity and increases receptor functionality (21, 24). The physiological role of the ADA-AR interactions is to make these receptors more sensitive to adenosine (21, 24). Besides these binary ADA-AR complexes, higher-order protein complexes containing both ADA and ARs have been postulated. We hypothesized the existence of functional heteromeric ADA- A_{1R} -dopamine D_1 receptor complexes in cortical neurons and proposed that their formation can be modulated by both dopamine and adenosine (27). In addition, we have shown that ADA anchored to the dendritic cell surfaces, most likely by the A_{2BR} , binds to CD26 expressed on the surface of the T cells (8). In this case, it has been postulated that ADA acts as a bridge

between dendritic cells and lymphocytes in the immunosynapse triggering costimulation. This costimulatory signal promotes an augmented T-cell activation with a T-helper 1 pattern and proinflammatory cytokine production, therefore enabling an enhanced immune response (28, 29).

Although the intermolecular contacts that contribute to and stabilize the CD26-ADA complex formation are known, the ADA portions involved in the interaction with ARs have not been studied. The aim of the present study was to characterize the regions of ADA involved in the interaction with ARs. For this purpose, we subjected to alanine scanning mutagenesis a number of ADA amino acid stretches predicted by docking experiments as likely involved in interaction with the A_{2AR} . The effects of the mutations on the catalytic efficiency of ADA and on the ADA-induced increase in agonist binding to A_{1R} and A_{2AR} led to predict the ADA amino acid stretches L58-I72 and A183-I188 as involved in AR recognition.

MATERIALS AND METHODS

Computational analysis

Docking simulations

We performed docking simulations between ADA and the A_{2AR} . Predictions of likely interfaces between ADA and the extracellular portions of the A_{2AR} , which drove *in vitro* alanine scanning mutagenesis done in this study, were carried out before the release of the first crystal structure of the A_{2AR} . The ZDOCK program was used (30). Since the original idea was to investigate whether a likely homodimeric architecture of the A_{2AR} could interact with both protomers in the crystallographic dimeric complex between ADA and CD26, we first predicted an A_{2AR} homodimer by using a computational model of the protomer (31). Quaternary structure predictions followed an established computational protocol (32–36). The predicted dimer, characterized by H4-H5 and I2-I2 contacts, was then employed as a fixed protein (*i.e.*, target), whereas ADA was employed as a mobile protein (*i.e.*, probe). As for the latter, both the H and G chains extracted from the dimeric complex with CD26 [Protein Data Bank (PDB) code 1W1I; ref. 19] were used. To improve sampling, the docking search excluded the transmembrane and cytosolic portions of the A_{2AR} (*i.e.*, 8–66, 79–138, 177–253, and 271–412) as well as the ADA portions interacting with CD26 (*i.e.*, 24–32, 74–94, and 124–145). A rotational sampling interval of 6° was employed, and the best 4000 solutions were retained and subjected to cluster analysis by using a C_α -root mean square deviation (RMSD) of 4.0 Å as a threshold. The latter was based on the QT clustering algorithm (37). Cluster centers were subjected to visual inspection. Only one docking pose was characterized by a simultaneous and symmetric interaction between the two A_{2AR} protomers in the dimer and the two ADA monomers. Only one docking pose turned out to be reliable and characterized by a simultaneous and symmetric interaction between the two A_{2AR} protomers in the dimer and two ADA protomers. This docking pose was shared by 3 low-populated clusters; *i.e.*, each made of 7, 5, and 4 solutions. The highest-scored solution belonged to the 7-solution cluster and was the 225th best-scored one out of 4000. In this complex, the following amino acid stretches from

ADA; *i.e.*, 58–66, 114–118, 155–158, and 184–188, were found to participate in the ADA-A_{2A}R interface. Those stretches were subjected to the *in vitro* alanine scanning mutagenesis shown in this study, which highlighted the 58–66 and 184–188 portions as playing a role in A_{2A}R recognition (see below). The current availability of a number of crystal structures of the human A_{2A}R imposed us to repeat the docking simulations to improve the resolution level of the prediction. Indeed, major differences in the extracellular portions between rhodopsin-based model and crystal structure reside in extracellular portion 2 (E2), which is significantly more exposed to the solvent in the crystal structure than in the model (results not shown). Therefore, the crystal structures of the human A_{2A}R in complex with the adenosine and (2S,3S,4R,5R)-5-(6-aminopurin-9-yl)-N-ethyl-3,4-dihydroxyoxolane-2-carboxamide [N-ethyl-5-carboxyamido-adenosine (NECA)] agonists (PDB code 2YDO and 2YDV, respectively; ref. 38) holding the complete 3 extracellular loops (ELs) were employed as targets. As for ADA, the 1WII:G chain, as well as the structures of isolated ADA in complex with the 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside (HDPR) transition-state analog (PDB code 1KRM; ref. 39) and of the unbound form (PDB code 1VFL; ref. 40) were employed as probes. The 3 ADA structures differ for the conformation and orientation of the 58–69 helix, which is closer to the 184–188 loop in 1KRM (closed form) than in the 1VFL structure (open form). Such amino acid stretches had indeed been predicted as participating in the ADA-A_{2A}R interface by early docking experiments and validated by *in vitro* alanine scanning mutagenesis (see below). We did not consider the 1WXY structure, since it is quite similar to 1VFL. The 1WII:G structure is, instead, between 1KRM and 1VFL, closer to the latter. To minimize indeterminations in the structural models of the target and probe proteins, both ADA and A_{2A}R were considered in their monomeric forms. Docking simulations and cluster analysis of the best 4000 docking solutions followed the same protocol described above. The centers of the most populated clusters were finally subjected to visual analysis.

Molecular dynamics (MD) simulations

MD simulations were carried out on the 1VFL and 1WXY structures of ADA, selected based on sequence completeness and resolution. These structures are very related, but 1VFL is bound to Zn ion, and 1WXY is additionally bound to the Fr104783 ligand. These two structures were used to generate starting models for MD simulations in both holo and apo forms (obtained by removing ligands). For this purpose, the monomeric crystal structure was fully solvated with an octahedron tip3p water box; ions were added, and final system was minimized and equilibrated to 300 K using amber force field (41) and implemented in the NAMD program (42, 43). Finally, 100 ns of production were collected in the isothermic-isobaric ($P=1$ atm, $T=298$ K). Particle mesh Ewald (44) was used to account for long-range electrostatic effects. RESPA (45) algorithm with a minimum integration step of 1 fs was used, keeping all bonds connecting hydrogens constrained using the RATTLE algorithm (46). Additional technical details on simulation setup, curation, and analysis are identical to those described elsewhere (47). Results from 4 dynamics are similar, and we observed a fluctuation from a “closed” state to an “open” one due to the movement of a helix, increasing solvent accessibility to the protein. All four dynamics show a normal behavior based on geometrical and energetic results. Typical trajectories are available in the MoDEL database (ref. 48; <http://mmb.pcb.ub.es/MoDEL/>). Optimal desolvation area calculations were performed on the collected trajectories defining the optimal patches from the center of coordinates of every residue side chain (49, 50).

Bacterial strains and vector

Escherichia coli S~ 3834, a multiple auxotroph (rpsL, Dadduid-man, metB, guaA, uraA:Tn 10) with a deletion of add (bacterial ADA gene), and plasmid pZC11-containing TAC-promoted wild-type human ADA cDNA (51) were used. Overnight cultures of pZC11-hADA transformants of S~ 3834 were inoculated into the appropriate volume of Luria-Bertani (LB) medium supplemented with carbenicillin and tetracycline (200 and 18.75 µg/ml, respectively) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Cells were grown with shaking at 37°C until an A_{600} nm = 1.0 and then were harvested and frozen at 80°C (18).

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed on the human ADA *wt* gene cloned into the pZC11 vector as described in the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit protocol (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Oligonucleotides were designed according to the guidelines described in the Stratagene protocol. One, 2, or 3 nucleotides, depending on the nucleotide sequence, were changed in order to obtain the desired mutation (Table 1). Polymerase chain reactions were carried out with 0.3 µM of each mutagenic primer (Sigma-Aldrich), 0.2 mM of each dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 50–100 ng of the template, 1 µl of 2.5 U/µl of PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene), and 5 µl of 10X reaction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.8; 20 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 100 mM (NH₄)₂SO₄; 1% Triton X-100; and 1 mg/ml nuclease-free bovine serum albumin) in a final volume of 50 µl. The samples were subjected to 12 cycles of amplification with denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 5 min using an iCycler thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Then, the reaction was cooled to 37°C and incubated for 1 h with 2 µl (10 U/µl) of *Dpn* I (Promega) at 37°C. The reaction product was transformed into *E. coli* S~ 3834 and grown overnight with the appropriate antibiotic, and colonies were checked in order to determine that only the desired mutation was present.

Partial purification of ADA

Recombinant wild-type and ADA mutants were partially purified from 4-L cultures of *E. coli* S~ 3834 cells, transformed with the plasmid pZC11 containing the cDNA of ADA. Unless otherwise indicated, all steps were carried out at 4°C. Cell pellets were resuspended in 40 ml of lysis buffer [10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 75 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM dithiothreitol; and a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) containing 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride to a final concentration of 1 mM]. The suspension was distributed into 20-ml batches, cooled on ice, and sonicated for 24 X 20 s in a Branson digital sonifier (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) at 15% intensity. The resulting homogenate was centrifuged at 105,000 *g* for 60 min, and protamine sulfate (Sigma-Aldrich) was slowly added to the clarified extract up to a final concentration of 2 mg/ml. After 60 min of constant stirring, the suspension was centrifuged as before, and the supernatant was dialyzed twice (~12 h) with continuous stirring against a 50X excess volume of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1 mM dithiothreitol and 3 mg/ml of activated charcoal (Sigma-Aldrich). The dialysate was applied (flow rate 20 ml/h) to a Q Sepharose HP (GE Healthcare Europe, Cerdanyola, Spain) anion exchanger column (5X5 cm) pre-equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and 1 mM dithiothreitol. The

TABLE 1. Mutagenic oligonucleotide primers

| Mutation | Primer | Codon position | Sequence |
|----------|--------------------|----------------|---|
| L58A | Forward Reverse | 172–174 | 5'-GACAAGCCGCTCACC _g cGCCAGACTTCCTG-3' 5'-CAGGAAGTCTGGC _g cGGTGAGCGGCTTGTC-3' |
| D60A | Forward Reverse | 178–180 | 5'-CCGCTCACCTTCCA _g cCTTCTCGGCCAAG-3' 5'-CTTGGACAGGAAGG _c TTGGAAGGGTGAGCGG-3' |
| F61A | Forward Reverse | 181–183 | 5'-CTCAACCTTCCAGAC _g cTCTGGCCAAGTTT-3' 5'-AAACTTGGCCAGA _g cGTCTGGAAGGGTGAG-3' |
| L62A | Forward Reverse | 184–186 | 5'-ACCCTTCCAGACTT _g cGGCCAAAGTTTGAC-3' 5'-GTCAAACCTTGGCCC _g cAAGTCTGGAAGGGT-3' |
| K64A | Forward Reverse | 190–192 | 5'-CAGACTTCTGGCC _g cATTTGACTACTACATGC-3' 5'-GCATGTAGTAGTCAAAT _g cGGCCAGGAAGTCTG-3' |
| F65A | Forward Reverse | 193–195 | 5'-CCTGGCCAAG _g cTGACTACTACATGCC-3' 5'-GGCATGTAGTAGTCA _g cCTTGGCCAGG-3' |
| D66A | Forward Reverse | 196–198 | 5'-CCTGGCCAAGTTT _g cTTACTACATGCCTGC-3' 5'-GCAGGCATGTAGTAA _g cAAACTTGGCCAGG-3' |
| M69A | Forward Reverse | 205–207 | 5'-GTTTACTACTACG _g cGCTGCTATCGCGGGCTG-3' 5'-CAGCCCGGATAGCAGC _g cCGTAGTAGTCAAAC-3' |
| I115A | Forward Reverse | 343–345 | 5'-CCAAAGTGGAGCCA _g cTCCTTGGAAACCAGCG-3' 5'-GCCTGGTTCCAGGGA _g cTGGCTCCACTTTGG-3' |
| N118A | Forward Reverse | 352–354 | 5'-GCCAATCCCCTGG _g cCCAGGCTGAAGG-3' 5'-CCTTCAGCCTGG _g cCCAGGGGATTGGC-3' |
| M155A | Forward Reverse | 463–465 | 5'-TCCATCCTGTGCTGC _g cGGCCACCAGCCC-3' 5'-GGGCTGTTGGCGC _g cGCAGCACAGGATGGA-3' |
| H157A | Forward Reverse | 469–471 | 5'-GCTGCATGGCG _g cTCAGCCAACTGG-3' 5'-CCAGTTGGGCTGA _g cGCCATGCAGC-3' |
| G184Q | Forward Reverse | 550–552 | 5'-CGATCCTGGCT _c agGATGAGACCATCC-3' 5'-GGATGGTCTCATC _t gAGCCAGGATCG-3' |
| D185A | Forward Reverse | 553–555 | 5'-CCTGGCTGGAG _c TGAGACCATCCC-3' 5'-GGGATGGTCTCA _g CTCCAGCCAGG-3' |
| L194A | Forward Reverse | 580–582 | 5'-GCAGCCTC _g cGCCCTGGACATGTCC-3' 5'-GGACATGTCCAGGGC _g cGAGGCTGC-3' |

Sequence mismatches are indicated in lowercase letters.

column was washed (20 ml/h) with 2 vol of equilibration buffer, and thereafter the enzyme was eluted (5-ml fractions) with 100 ml of a linear NaCl gradient (0–0.25 M) in the equilibration buffer. ADA active fractions were always recovered in the same fractions with a similar yield (60–70%). Eluates with highest ADA content were pooled, desalted with a PD10 (GE Healthcare) gel filtration column, preequilibrated with 50 mM, pH 7.4, Tris-HCl buffer, and stored at 4°C for their immediate use within the next 24 h. The amount of ADA in these samples was evaluated by immunoblotting, using a standard curve obtained with known amounts of pure wild-type human ADA, purified by the method of Gracia *et al.* (21), performed as internal control in each experiment.

Enzyme activity and ADA inhibition

Unless otherwise indicated, enzyme activity was determined at 25°C with 0.1 mM adenosine as substrate in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The decrease in the absorbance at 265 nm ($\Delta\epsilon=7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was monitored in an Ultrospec 3300 pro spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK); 1-ml cuvettes with a 1-cm light path length were used. One unit (U) of ADA activity is defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μmol of adenosine per minute in the conditions of the assay. Hg²⁺ or deoxycoformycin inactivation of wild-type ADA was performed by a preincubation (2 h for Hg²⁺ or 30 min for deoxycoformycin) of 15 U/ml of desalted ADA with 100 μM HgCl₂ or 10 nM deoxycoformycin, and removal of free inhibitor by two consecutive gel filtrations, as described previously (22). No residual activity was found after adding a high excess (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of inhibited

enzyme to 0.1 mM adenosine for 4 h in the conditions described above or when the activity was determined after 2 h incubation of the enzyme in the buffer used to obtain the enzyme or in the buffer used for ligand binding (Supplemental Table S1). To check that Hg²⁺-treated ADA remains inactive during binding assays, we performed a competition curve of the A₁R agonist [³H] (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(hydroxymethyl)-5-[6-[[2*S*]-1-phenylpropan-2-yl]amino]purin-9-yl]oxolane-3,4-diol {N⁶-(2-phenylisopropyl)-adenosine [(R)-PIA]} binding *vs.* increasing adenosine concentrations in the presence of untreated ADA or in the presence of Hg²⁺-inhibited ADA (Supplemental Fig. S1). In the presence of untreated ADA the [³H] (R)-PIA binding was unchanged according to the degradation of the competing adenosine by the active ADA. In contrast, in the presence of Hg²⁺-inhibited ADA, we obtained a competition curve in which the [³H] (R)-PIA binding diminished when increasing adenosine concentration, according to the lack of enzymatic activity of Hg²⁺-inhibited ADA.

Kinetic parameters

Steady-state kinetic measurements were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) using a series of 6 concentrations of adenosine (ranging from 10 μM to 1 mM) and a constant enzyme concentration for which the initial steady-state velocities were measured with <10% substrate depletion for the first 30–120 s of the reaction. Inhibition studies were carried out by monitoring the hydrolysis rates of adenosine, as outlined before, in the presence of 3 increasing constant concentrations of purine riboside (ranging from 5 μM to 0.5

mM; Sigma-Aldrich). In all cases, a minimum of 4 replicates for each single experimental point were performed. Kinetic parameters were obtained by fitting the experimental data to the appropriate rate equations by nonlinear regression, using the commercial Graft curve-fitting software (Erithacus Software, Surrey, UK). Parameters are expressed as values \pm SE.

Protein determination

Protein was quantified by the bicinchoninic acid (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) method (52) using bovine serum albumin dilutions as standard.

Electrophoresis and immunoblotting

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out using homogeneous slab gels (12% acrylamide running gel and 4% stacking gel) that were electrophoresed at 35 mA/gel constant current for 90 min in a miniprotean system (Bio-Rad Laboratories SA, Barcelona, Spain). The Rainbow molecular weight markers (GE Healthcare) were used as standards, and proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich). For immunoblotting, proteins separated by SDS-PAGE were transferred to Hybond-P polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare), using wet Bio-Rad Trans-Blot equipment. Membranes were consecutively incubated with 2.5 μ g/ml rabbit anti-human ADA and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce), diluted 1:40,000, as primary and secondary antibodies, respectively. After washing, they were subsequently incubated with chemiluminescence detection solutions (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce). Band images were obtained using an image analyzer (LAS-3000; Fuji Film, Tokyo, Japan) and quantified using the Multi Gauge V3.0 software (Fuji Film).

Brain striatal membrane preparations and radioligand binding experiments

As a source of A₁R and A_{2A}R, we used sheep brain striatal membranes, since we previously determined that human ADA produces similar effects on human and sheep A₁R and A_{2A}R (ref. 21 and results not shown). Membrane suspensions from sheep brain striatum were prepared as described previously (53). Tissue was disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 20 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for three 5-s periods in 10 vol of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing a protease inhibitor cocktail (1:1000; Sigma-Aldrich). Membranes were then obtained by centrifugation at 105,000 *g* (40 min, 4°C), after eliminating cell debris by centrifugation (1000 *g*, 10 min, 4°C), and the pellet was homogenized and centrifuged under the same conditions. Membranes were stored at –80°C and were washed once more as described above and homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use.

ADA dose-dependent curves were obtained by incubating (2 h) striatal membrane suspensions (0.3 mg of protein/ml) with A₁R agonist [³H] (R)-PIA (0.5 nM, 30 Ci/mmol; Moravak Biochemicals Inc., Brea, CA, USA) or A_{2A}R agonist [³H] 3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*S*)-5-(ethylcarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]phenyl]propanoic acid (CGS21680; 20 nM, 42.7 Ci/mmol; Perkin Elmer, Boston, MA, USA) in the absence or in the presence of the indicated amounts of the wild-type or mutant ADA at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl₂. In all cases, free and membrane-bound radioligand were separated by rapid filtration of 500- μ l aliquots in a cell harvester (Brandel,

Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% polyethylenimine (Sigma-Aldrich), which were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer. The filters were incubated with 10 ml of Ecoscint H scintillation cocktail (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) overnight at 23°C, and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Downers Grove, IL, USA) with an efficiency of 62% (53). Nonspecific binding was defined as the binding remaining in the presence of 10 μ M (R)-PIA or 10 μ M CGS21680 (Sigma-Aldrich).

RESULTS

Prediction of likely interfaces between ADA and A_{2A}R

Docking simulations between ADA and the human A_{2A}R, which served to drive the *in vitro* experiments, were carried out when no high-resolution structure of the A_{2A}R was available (see Materials and Methods). Such simulations highlighted the contribution of the 58–66, 114–118, 155–158, and 184–188 portions of ADA to the ADA-A_{2A}R interface. The crystal structures of the agonist-bound forms of A_{2A}R characterized by a complete determination of the extracellular portions were released in May 2011 (38). Therefore, in order to improve the accuracy of the predicted ADA-A_{2A}R interface, we have redone docking experiments by using both the crystal structures of the adenosine- and NECA-bound forms of the A_{2A}R (PDB codes 2YDO and 2YDV, respectively). Only the results of such experiments are shown. Since it has been observed that ADA has two distinct conformations, named the open form and the closed forms (40, 54–56), in which the structural gate of the active site pocket (the α helix, T57–A73, and the peptide backbone of a β strand, L182–D185) have different conformations, three different crystal structures of the ADA protomer were probed. These structures differ in the opening of the structural gate to the catalytic pocket; *i.e.*, in the distance between the amino acid stretches L58–I72 and A184–I188. The best 4000 solutions from docking simulations between the 1YDV A_{2A}R structure and the 1WII:G ADA structure were divided into 341 clusters, 48 of which made \geq 20 solutions and covered 32% of the total docking poses. Selection of the likely interface was based on a docking score, cluster population, reliability of the complex in the context of the membrane topology of the A_{2A}R, and minimization of bad contacts. Indeed, the selected docking pose was the top hit solution, *i.e.*, solution 1; it fell in the second most populated cluster (made of 62 solutions), and, in line with the results of early docking simulations, it was characterized by a central role for the amino acid stretches 54–67 and 184–189 (Fig. 1A, violet and orange stretches, respectively) in recognizing the extracellular portions of the A_{2A}R. In detail, the 55–65 helix (Fig. 1A, violet) interacts with the receptor EL2, whereas the 184–189 stretch (Fig. 1A, orange) interacts with the N terminus of the receptor. Salt bridge interactions can form between D60 of ADA and

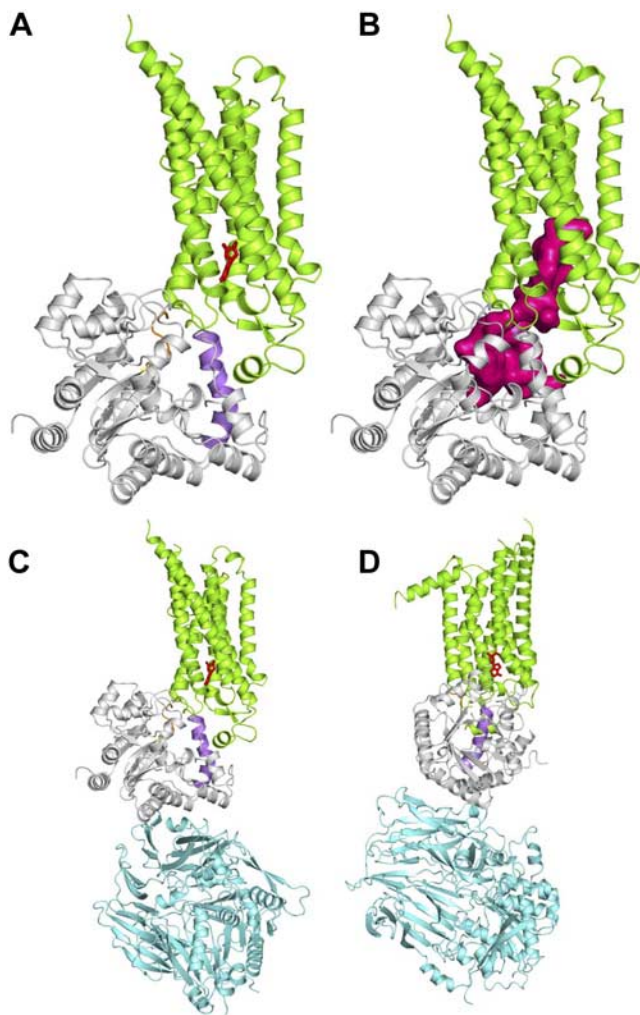


Figure 1. Predicted complex between ADA and A_{2A}R. *A*) Cartoons of A_{2A}R (lemon-green) in complex with ADA (gray). Such a complex is solution 1 of 4000 docking solutions (*i.e.*, the best one). A_{2A}R is shown in a direction parallel to the membrane surface, with the intracellular side on top. ADA amino acid stretches 58–72 and 183–188 interacting with the receptor are shown in violet and orange, respectively. Adenosine is represented as red sticks. *B*) Same view as in *A*; the channel connecting the adenosine binding site in A_{2A}R with the catalytic site of ADA is highlighted in magenta. Such a crevice was computed by the AutoDock tool AutoLigand (63). *C, D*) Two views of the quaternary complexes between adenosine-bound A_{2A}R (lemon-green), ADA (gray), and CD26 (cyan). Adenosine agonist is represented as red sticks.

both K150 and K153 of the A_{2A}R, as well as between D185 of ADA and the positively charged N terminus of the A_{2A}R. Other interactions include K54^{ADA}-D261^{A_{2A}R}, D66^{ADA}-H155^{A_{2A}R}, and D118^{ADA}-H155^{A_{2A}R}. It is worth noting that a channel connects the adenosine binding site in the A_{2A}R and the catalytic pocket of ADA (Fig. 1*B*). Remarkably, the predicted ADA-A_{2A}R docking mode is such that ADA can make a complex, in which ADA acts as a bridge between A_{2A}R and CD26 (Fig. 1*C, D*). For the docking between A_{2A}R and the 1VFL (unbound open form) and 1KRM (HDPR-bound structure, closed form) structures, in both cases, docking solutions similar to the predicted one could be found,

though lower docking scores were found for the closed form.

Mapping potential protein-protein interaction sites on different conformational states of ADA

We investigated the intrinsic flexibility of ADA by MD simulations. MD simulations were carried out on the 1VFL and 1WXY structures of ADA. Analysis of 4 MD runs clearly yielded 2 states of the enzyme, one in an open form and the other in a closed form (see Supplemental Figs. S2–S7). Supplemental Figs. S3 and S6 show the RMS of the backbone during the trajectory after minimization for both 1VFL and 1WXY ADA structures. Fluctuation of structures below 2 Å is expected for proteins at that size of runs (10 ns). Supplemental Figs. S4 and S7 show the evolution of solvent accessible area during the dynamics for both 1VFL and 1WXY ADA structures. No changes are observed, as expected, and solvent accessible area is almost constant. The main difference between these two states is a change in the conformation of an α helix (residues 58–72) and a loop (residues 182–185) on the catalytic site of the enzyme (see Supplemental Figs. S2 and S5). In the open state, these regions are in a more relaxed conformation, allowing the ligand to enter and leave the catalytic site. In the closed state, the conformation is more rigid and does not allow movement of adenosine. These conformational states correspond to the ADA open and closed forms detected previously (40, 54–56). The 1KRM crystallographic structure (a claimed closed form) is more similar to the closed form obtained by MD (RMSD=1.1 Å) than to the open form obtained by MD (RMSD = 1.9 Å) and the type of open ↔ closed transition is exactly the one found in MD simulations, giving support to these conformational states corresponding to the ADA open and closed forms detected previously. However, it is important to note that the 1KRM structure shows a stronger packing of the helix than that found even for the closed state in our MD simulations (Supplemental Fig. S8). Optimal desolvation area (ODA) is one of the driving forces for protein-protein interactions, therefore ODA calculations were used to map potential interaction sites on the surface of ADA. We followed patches of ODA during the entire simulation period for the open and closed states. In line with predictions of docking experiments, a combination of data coming from ODA calculations, distance measurements, and binding energy determinations highlighted the L58-Y67 and A183-D185 ADA stretches as potentially involved in protein-protein interactions.

Mutagenesis, expression, and partial purification of ADA mutants

We have chosen representative ADA mutations that cover the different putative amino acid stretches involved in the interaction of ADA with the AR deduced from docking studies. The ADA mutants included

alanine substitutions for L58, D60, F61, L62, K64, F65, D66, M69, I115, N118, M155, H157, D185, L194, and glutamine substitution for G184. The mutated positions in the primary and secondary structure of ADA are shown in **Fig. 2**. ADA mutations were generated by site-directed mutagenesis directly into the pZC11 plasmid containing the human ADA cDNA, as described in Materials and Methods, using the mutagenic oligonucleotide primers described in Table 1. Mutants were expressed in an ADA-deficient *E. coli* strain, *E. coli* SΦ 3834, under standardized conditions. To check the ADA expression, immunoblot bands for the enzyme were quantified in supernatants of sonicated ADA-expressing *E. coli* SΦ 3834 extracts (see Materials and Methods). As assessed by immunoblotting, ADA mutants were usually well expressed, ranging from 29 to 141% of the value obtained with the wild-type enzyme, 80 μg/ml (**Fig. 3**; see Supplemental Fig. S9 for the whole Western blotting images).

To investigate the ADA epitopes involved in the interaction with ARs, partially purified preparations of the wild-type and mutant enzymes were used. The purification protocol includes a protamine sulfate treatment to remove nucleic acids and an anionic-exchange chromatography through Q-Sepharose, as detailed in Materials and Methods. In all cases, the enzyme was recovered in the same fractions with a similar yield (60–70%). However, the specific activity of several ADA mutants was clearly different from the value corresponding to the wild-type enzyme (**Table 2**). This fact strongly suggests the existence of changes in the catalytic efficiency of ADA due to modifications in the kinetic parameters of the enzyme.

Steady-state kinetic parameters for the wild-type and mutant enzymes

To examine the effect of mutations on the catalytic behavior of ADA, the kinetic parameters of the purified wild-type and ADA mutants were determined using

adenosine as substrate. The values of K_m , k_{cat} , and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m), for the recombinant enzyme and for the different mutants were determined. In addition, to further probe the extent of the conservation of the active site pocket structure, the affinity constant for a ground-state inhibitor, purine riboside [$K_{i(PR)}$], acting as a competitive inhibitor of the enzyme with respect to the adenosine, was also determined. The kinetic data are summarized in **Table 3**. For D66, I115, and L194 mutants, very similar parameters, compared to the wild-type enzyme, were obtained and, only moderate differences in some of the kinetic parameters were detected for the D60, K64, N118, H157, G184, and D185 mutants. Mutations in F61, F65, M69, and M155 cause a decrease of one order of magnitude in the catalytic efficiency. For F61 or M69 mutated enzymes, the decrease in the catalytic efficiency was due to a decrease in k_{cat} but not in K_m values, indicating that the mutations are important to reach V_{max} . For M155 or F65 mutated enzymes, both k_{cat} and K_m values were altered, indicating that both V_{max} and the affinity for the substrate were decreased. Finally, the major alterations in the k_{cat} and the K_m were detected for L58 and L62 mutants, resulting in a decrease of two orders of magnitude on their catalytic efficiency. For these mutants, changes detected on both the k_{cat} and K_m values indicate that both the substrate affinity and the maximum velocity were decreased, suggesting that these mutations alter the structure of the catalytic pocket. This was corroborated by the 70-fold higher $K_{i(PR)}$ value obtained for these mutants compared to the wild-type enzyme.

Effect of ADA mutations on the agonist binding to A₁R and A_{2A}R

To investigate whether the mutated amino acids on the ADA molecule are involved in the interaction with the ARs, we compared the agonist binding to A₁R and A_{2A}R in the absence of ADA, in the presence of wild-type

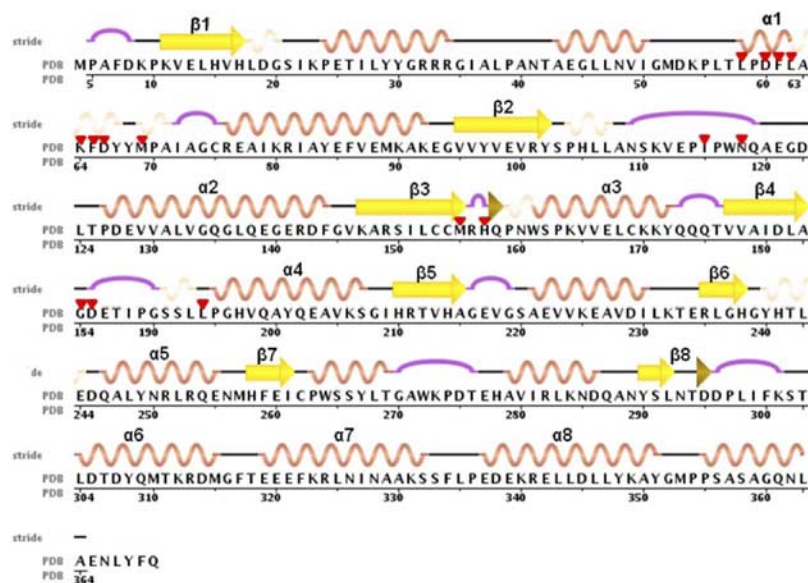


Figure 2. Primary and secondary structure of human ADA. Point mutations generated by site-directed mutagenesis are shown with red triangles. Primary α helices are shown in pink, β strands are in yellow, hydrogen-bonded turns are in purple, and isolated residues forming β bridges are in brown. Image generated with the algorithm developed by Frishman and Argos (64).

| Enzyme | Immunoblotting | [ADA] (Q-Sepharose) ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------|----------------|--|
| Wild type | | 80 \pm 10 |
| L58A | | 113 \pm 5 |
| D60A | | 50 \pm 10 |
| F61A | | 80 \pm 10 |
| L62A | | 60 \pm 10 |
| K64A | | 60 \pm 6 |
| F65A | | 62 \pm 2 |
| D66A | | 78 \pm 7 |
| M69A | | 50 \pm 10 |
| I115A | | 37 \pm 6 |
| N118A | | 80 \pm 10 |
| M155A | | 23 \pm 3 |
| H157A | | 70 \pm 10 |
| G184Q | | 32 \pm 5 |
| D185A | | 34 \pm 3 |
| L194A | | 100 \pm 10 |
| S Φ 3834 | | 0 |

Figure 3. Expression of wild-type and mutant ADA. ADA expression was detected by immunoblotting, as described in Materials and Methods, using supernatants of sonicated ADA-expressing *E. coli* S Φ 3834 extracts. Quantification of the immunoblot band was done by interpolation in a standard curve obtained by immunoblotting known amounts of pure human ADA as an internal control in each experiment (see Materials and Methods). Values are means \pm SE of 3 independent experiments.

ADA, or in the presence of mutated ADA. We performed these experiments with increasing concentrations of ADA to determine, from the dose-response curves, the amount of the enzyme able to produce the 50% of the maximum agonist binding increases (EC_{50} values). This is a parameter related to the enzyme affinity for the receptors. We also determined the ADA-induced maximum effect, *i.e.*, the effect on ligand binding produced by the highest ADA concentration.

ADA dose-response curves were obtained by incubating (2 h) brain membrane suspensions (0.3 mg of protein/ml) with 0.5 nM [^3H] (R)-PIA or 20 nM [^3H]CGS21680 in the presence or in the absence of increasing amounts of the wild-type or mutant ADA (0.1 $\mu\text{g/ml}$ to 100 $\mu\text{g/ml}$) at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 10 mM MgCl_2 , as described in Materials and Methods. Wild-type ADA dose-responsively enhanced (R)-PIA binding to striatal $A_1\text{R}$ (Fig. 4A, black curve) and CGS21680 binding to striatal $A_{2A}\text{R}$ (Fig. 4C, black curve), with EC_{50} values of 8 and 7 ng/ml, respectively, and with a maximum ligand binding increase of $\sim 85\%$ with respect to the ligand binding in the absence of ADA (Table 4). According to our previous results (21, 22, 24), the ADA effect was independent of its enzymatic activity, since a similar effect of wild-type ADA was observed using ADA inhibited with HgCl_2 , as described in Materials and Methods (Table 4). In contrast, the effect of wild-type ADA on $A_1\text{R}$ and $A_{2A}\text{R}$ was completely blocked when the enzyme was inhibited by preincubation (30 min) with 10 nM of the transition-state irreversible inhibitor deoxycoformycin (Table 4). Since deoxycoformycin stabilizes the closed form of the enzyme (54), the results indicated that the closed form is not able to induce the AR modulation.

To analyze the effect of ADA containing mutations within the α -1 helix, alanine substitutions for L58, D60, F61, L62, K64, F65, D66, and M69 (stretch L58-I72; Fig. 1A, violet) were performed (see Fig. 4E), tested on agonist binding to $A_1\text{R}$ and $A_{2A}\text{R}$ and compared with that of ADA wild type. From the ADA dose-response curves shown in Fig. 4, the EC_{50} and maximum increase of binding values were calculated and appear in Table 4. Whereas mutation of D66 did not lead to any significant differential effect, the other mutants were less efficient than wild-type ADA in enhancing the agonist binding to one or both receptors. Whereas

TABLE 2. Specific activity of wild-type and ADA mutants

| Enzyme | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|-----------|---|
| Wild type | 41.0 |
| L58A | 3.1 |
| D60A | 12.4 |
| F61A | 3.0 |
| L62A | 3.2 |
| K64A | 16.0 |
| F65A | 3.6 |
| D66A | 44.0 |
| M69A | 1.5 |
| I115A | 24.0 |
| N118A | 19.0 |
| M155A | 3.8 |
| H157A | 38.0 |
| G184Q | 10.5 |
| D185A | 6.9 |
| L194A | 48.0 |

Wild-type and mutant enzymes were partially purified as indicated in Materials and Methods. Specific activity was determined using the substrate concentration that gives V_{max} , and protein concentration was measured by the bicinchoninic acid method.

TABLE 3. Steady-state kinetic parameters for the wild-type and ADA mutants

| Enzyme | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (μM) | k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$) | K_i (PR) (μM) |
|--------|------------------------|-------------------|-----------------------------------|------------------------|
| WT | 190 ± 20 | 26 ± 3 | 7.3×10^6 | 13 ± 2 |
| L58A | $9 \pm 1^{**}$ | $183 \pm 12^{**}$ | 0.051×10^6 | $>1000^{**}$ |
| D60A | $87 \pm 9^{**}$ | 23 ± 3 | 3.8×10^6 | 11 ± 3 |
| F61A | $13 \pm 2^{**}$ | 25 ± 2 | 0.52×10^6 | 20 ± 2 |
| L62A | $19 \pm 2^{**}$ | $250 \pm 30^{**}$ | 0.074×10^6 | $>1000^{**}$ |
| K64A | $92 \pm 8^{**}$ | 40 ± 6 | 2.3×10^6 | 32 ± 3 |
| F65A | $80 \pm 10^{**}$ | $200 \pm 17^{**}$ | 0.4×10^6 | $>1000^{**}$ |
| D66A | 176 ± 19 | 33 ± 4 | 5.3×10^6 | 26 ± 2 |
| M69A | $10 \pm 1^{**}$ | 25 ± 2 | 0.4×10^6 | 11 ± 2 |
| I115A | $140 \pm 12^*$ | 28 ± 3 | 5.0×10^6 | 15 ± 3 |
| N118A | $100 \pm 12^{**}$ | 35 ± 2 | 2.86×10^6 | 25 ± 3 |
| M155A | $63 \pm 5^{**}$ | $100 \pm 8^{**}$ | 0.63×10^6 | $130 \pm 8^{**}$ |
| H157A | 170 ± 20 | 40 ± 6 | 4.25×10^6 | $51 \pm 4^{**}$ |
| G184Q | $115 \pm 10^{**}$ | $78 \pm 4^{**}$ | 1.47×10^6 | $120 \pm 10^{**}$ |
| D185A | $80 \pm 6^{**}$ | 50 ± 3 | 1.6×10^6 | $118 \pm 8^{**}$ |
| L194A | 173 ± 15 | 25 ± 2 | 6.9×10^6 | 15 ± 2 |

Steady state kinetic measurements were performed as indicated in Materials and Methods; values are means \pm SE of 3 separate experiments. Statistical differences with regard to control (wild-type ADA) were evaluated using 1-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison *post hoc* test. PR, purine riboside. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

mutations of D60, F61, K64, and F65 moderately affected the EC_{50} value or the maximum binding enhancement or both, mutation of M69 resulted in a lack of effect on $A_{2A}R$ binding paralleled with a 42-fold

increase in the EC_{50} value on the effect on A_1R binding. Finally, mutations of L58 and L62 were unable to significantly affect agonist binding to A_1R or to $A_{2A}R$ at concentrations < 1000 ng/ml. These results indicate

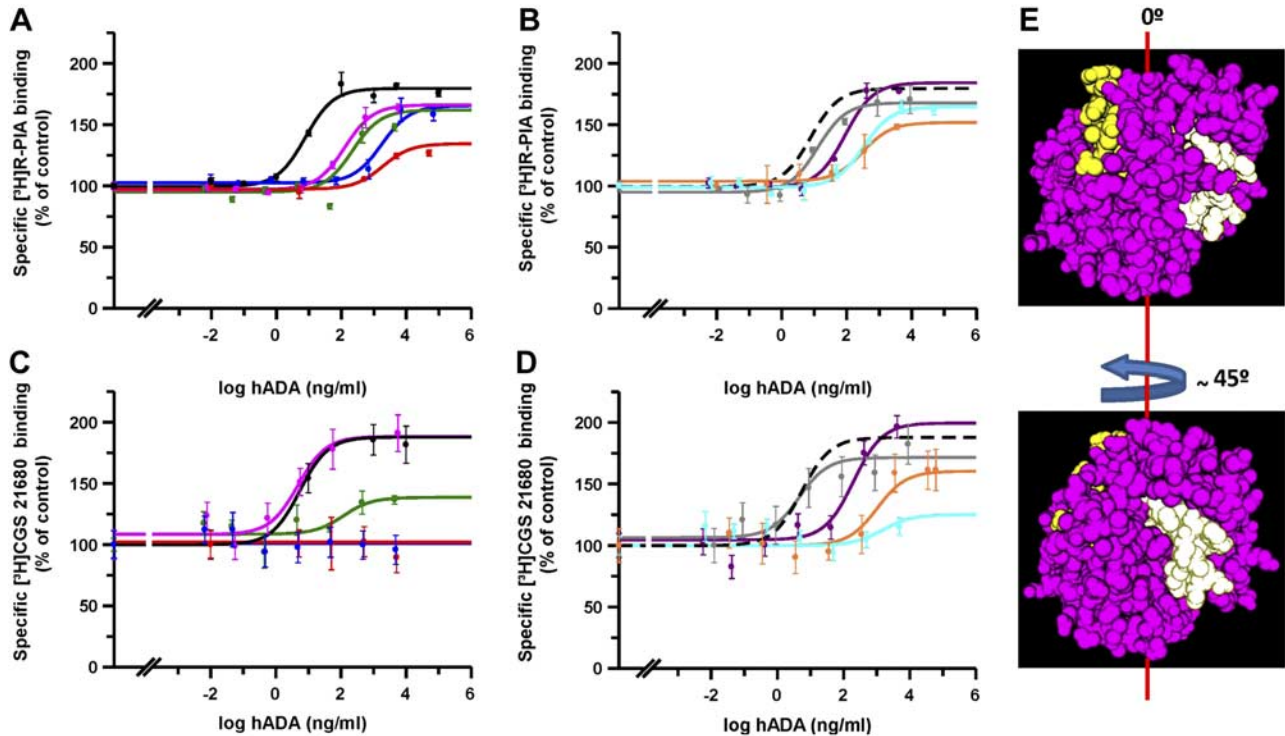


Figure 4. Effect of ADA helix α -1 mutations on agonist binding to A_1R and $A_{2A}R$. Binding of 0.5 nM [³H] (R)-PIA (A, B) and 20 nM [³H]CGS21680 (C, D) to brain striatal membranes (0.3 mg of protein/ml) was performed as described in Materials and Methods, in the absence or in the presence of increasing concentrations of ADA mutants. A, C) Dose-response curves corresponding to the mutants L58A (blue), D60A (green), F61A (magenta), and L62A (red). B, D) Dose-response curves corresponding to the mutants K64A (dark magenta), F65A (orange), D66A (gray), and M69A (cyan). Human ADA wild type is represented in black (continuous or dotted curve). Data are means \pm SE from a representative experiment ($n=3$) performed in triplicates. E) Surface representations of human ADA; helix α -1 (L58-I72) is shown in white, and helix α -2 (CD26 binding site, P126-D143) is in yellow. ADA (MMDDBID:75950) was drawn with Cn3D4.1 program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

TABLE 4. Effect of wild-type and mutant ADA on the agonist binding to A₁R and A_{2A}R

| Enzyme | A ₁ R | | A _{2A} R | |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|
| | Δ[³ H](R)PIA binding (%) | EC ₅₀ (ng/ml) | Δ[³ H]CGS21680 binding (%) | EC ₅₀ (ng/ml) |
| WT | 84 ± 6 | 8 ± 2 | 88 ± 10 | 7 ± 3 |
| WT+HgCl ₂ | 86 ± 4 | 10 ± 3 | 80 ± 5 | 9 ± 3 |
| WT+ DC | 0** | >1500** | 0** | >1500** |
| L58A | 62 ± 5 | >1500** | 0** | >1500** |
| D60A | 54 ± 3* | 250 ± 30** | 30 ± 7** | 120 ± 10** |
| F61A | 65 ± 8 | 130 ± 20** | 90 ± 10 | 12 ± 4 |
| L62A | 34 ± 7** | >1500** | 0** | >1500** |
| K64A | 85 ± 7 | 90 ± 10* | 95 ± 8 | 200 ± 4** |
| F65A | 48 ± 9** | 310 ± 40** | 50 ± 10* | 970 ± 120** |
| D66A | 73 ± 6 | 13 ± 2 | 65 ± 10 | 4 ± 2 |
| M69A | 66 ± 4 | 330 ± 30** | 25 ± 6** | >1500** |
| I115A | 60 ± 10 | 10 ± 3 | 84 ± 8 | 5 ± 2 |
| N118A | 88 ± 8 | 10 ± 4 | 80 ± 8 | 5 ± 2 |
| M155A | 95 ± 10 | 120 ± 20** | 92 ± 7 | 210 ± 60** |
| H157A | 86 ± 5 | 7 ± 4 | 71 ± 9 | 11 ± 4 |
| G184Q | 89 ± 7 | 44 ± 7* | 75 ± 8 | 24 ± 4 |
| D185A | 70 ± 8 | 112 ± 10** | 40 ± 10** | >1500** |
| L194A | 87 ± 6 | 12 ± 4 | 81 ± 10 | 9 ± 6 |
| S03834 | 0** | >1500** | 0** | >1500** |

EC₅₀ value is the amount of wild type or mutant ADA that is able to produce the 50% of the maximum increase in 0.5 nM [³H] (R)-PIA binding to A₁R (Δ[³H](R)PIA binding) or 20 nM of [³H]CGS21680 binding to A_{2A}R (Δ[³H]CGS21680 binding). Values are means ± SE of 3 separate experiments. Statistical differences with regard to control (wild-type ADA) were evaluated using 1-way ANOVA followed by a Dunnett's multiple comparison *post hoc* test. DC, deoxycoformycin. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

that α-1 helix and its residues 58 and 62 are important for the ADA effect on A₁R and A_{2A}R and that M69 is affecting more the binding to A_{2A}R than to A₁R.

The effect of mutations in stretches 2 and 3, which are loops located near the α-1 helix in the tertiary structure of the enzyme (Fig. 5C, D), were tested as well. These stretches contain residues P114-N118 and M155-Q158 (see Fig. 2). The ADA dose-response effect on agonist binding to A₁R and A_{2A}R were determined using the same protocol described above. From these curves (Fig. 5), the values of EC₅₀ and maximum binding increase were calculated and appear in Table 4. Mutations of I115, N118, and H157 did not produce any significant change in the EC₅₀ values nor in the maximum effect when compared to the effect of wild-type ADA on both A₁R and A_{2A}R. Despite the finding that mutation of M155 moderately increased the EC₅₀ values without significantly affecting the maximum effect, these results suggest that these regions in the enzyme are not very important for the ADA-AR interaction. The moderate effect of the M155A mutant may be due to a structural alteration transmitted to the tertiary structure of the protein, affecting the conformation of the α-1 helix.

Finally, we tested the effect of mutations in stretch 4, the loop containing the residues A183-I188 (Fig. 1A, orange). This portion is also relatively close to the L58-I72 α-1 helix in the tertiary structure of the enzyme (Fig. 6C, D) and acts with the α-1 helix as a structural gate to close the catalytic pocket after substrate binding (40). The ADA dose-response effect on agonist binding

to A₁R and A_{2A}R was determined using the same protocol described above. From these curves (Fig. 6), the values of EC₅₀ and maximum binding increase were calculated and appear in Table 4. The G184Q and D185A mutants produced moderate and strong increase in the EC₅₀ values, respectively, without significant (G184Q) or moderate (D185A) changes in the maximum effect compared to wild-type ADA. These results suggest that this loop is important for ADA-induced modulation of the ARs. As a control, we tested the effect of alanine substitution for L194, since this residue in ADA does not seem to be related to stretches 1 and 4 (see Figs. 2 and 6D). From the dose-response curve (Fig. 6), the effect of such a mutant on both EC₅₀ and maximum binding was determined (Table 4) and was similar to those exerted by wild-type ADA (Table 4). As a further negative control, we used purified preparations of nontransformed *E. coli* SΦ 3834 extracts that do not contain any significant ADA. The dose-response curve using these preparations appears in Fig. 6 and indicates that *E. coli* SΦ 3834 preparations devoid of endogenous or recombinant ADA did not show any effect on agonist binding to A₁R or A_{2A}R (Table 4).

DISCUSSION

Many proteins are known to undergo big conformational changes on interacting with substrates, ligands, or other macromolecules. In the case of ADA, it has been observed that this enzyme has two distinct confor-

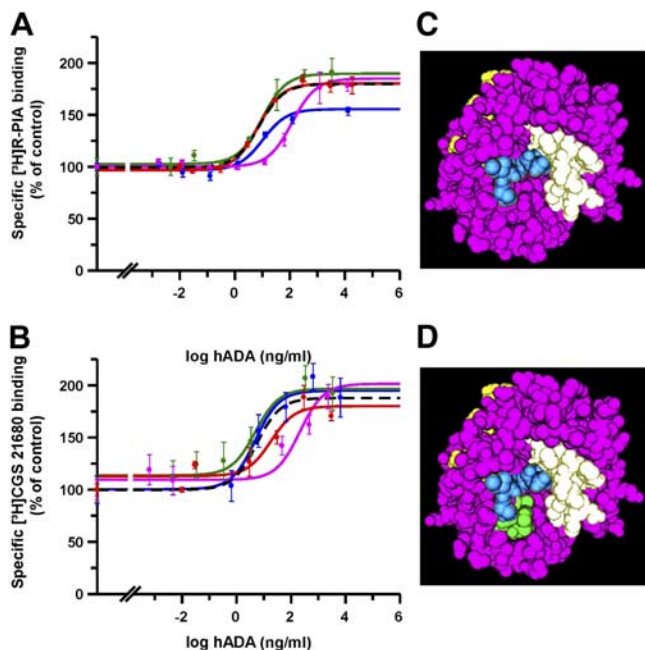


Figure 5. Effect of ADA mutations on 114-118 and 155-158 loops on agonists binding to A_1R and $A_{2A}R$. *A, B*) Binding of 0.5 nM [3H] (R)-PIA (*A*) and 20 nM [3H]CGS21680 (*B*) to brain striatal membranes (0.3 mg of protein/ml) was performed as described in Materials and Methods, in the absence or in the presence of increasing concentrations of ADA mutants. Dose-response curves correspond to the mutants I115A (blue), N118A (green), M155A (magenta), and H157A (red); human ADA wild type is represented in black (dotted curves). Data are means \pm SE from a representative experiment ($n=3$) performed in triplicates. *C, D*) Surface representations of human ADA; helix α -1 (L58-I72) is shown in white, helix α -2 (CD26 binding site, P126-D143) is in yellow, P114-N118 residues are in blue, and M155-G158 residues are in green (*D*). ADA (MMDBID:75950) was drawn with Cn3D4.1 program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

mations, named the open form and the closed form (40, 54–56). The enzyme holds an α/β -barrel architecture and a TIM-barrel topology with a deep active site pocket and an essential tightly bound Zn^{2+} ion. Controlling access to the active site pocket is a structural gate consisting of an α helix (T57-A73) and the peptide backbone of a β strand (L182-D185). In the absence of substrate, the structural gate is open, and in the presence of substrate or inhibitors, such as deoxycoformycin or purine riboside, a conformational change can be detected, and the active site is in the closed form (39, 40, 54, 56–58), yet still largely solvent accessible in the closed mammalian ADA structures (59). Here we demonstrated that mutations of hydrophobic residues L58 and L62 on the structural gate α -1 helix results in a 2-order-of-magnitude decrease of the catalytic efficiency by decreasing both the substrate affinity and the maximum velocity. These results suggest that hydrophobicity may help to maintain the affinity for adenosine and control catalysis.

ADA is able to modulate the ligand binding to ARs. Docking simulations predicted that the two amino acid stretches that participate in the structural gate of the

active site pocket (Fig. 1A, violet and orange) participate in the interface between the agonist-bound form of $A_{2A}R$ and ADA. In line with docking predictions, alanine scanning mutagenesis demonstrated that these amino acid stretches play a central role in ADA-induced modulation of agonist binding to both the A_1R and $A_{2A}R$ subtypes. If the interacting portion between ADA and ARs is the structural gate, the region controlling open and closed forms, it seems reasonable to postulate that the open and closed forms of the enzyme may not interact equally with A_1R or $A_{2A}R$. In line with this hypothesis, the open forms of ADA gave better docking scores than the closed one. We observed that wild-type ADA is able to increase ligand binding to ARs in brain striatal membranes in the absence of the endogenous substrate adenosine. Since ADA is in the open form under these conditions (39, 40, 56), it appears that it is the open form that is able to bind to A_1R and $A_{2A}R$. This hypothesis is strengthened by the observation that in the presence of deoxycoformycin, a transition-state inhibitor of ADA that stabilizes the closed form (54), the effect of ADA on agonist binding to A_1R and $A_{2A}R$ is blocked (Table 4), in agreement with our previously

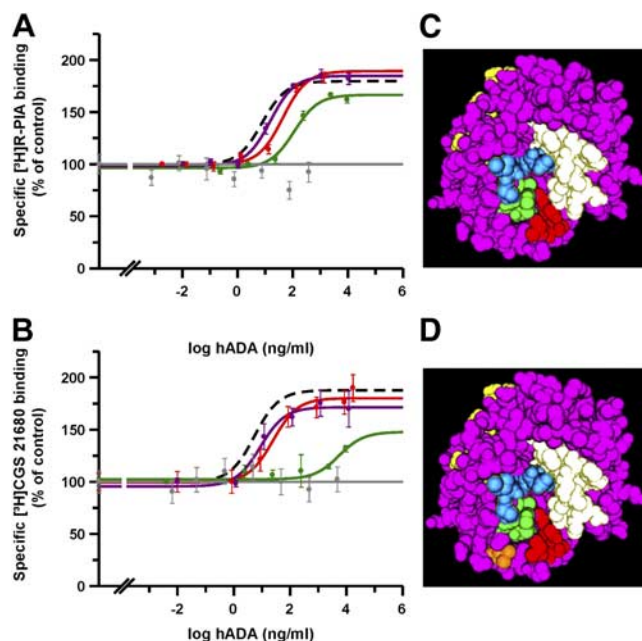


Figure 6. Effect of ADA mutation on 183-188 loop on agonists binding to A_1R and $A_{2A}R$. *A, B*) Binding of 0.5 nM [3H] (R)-PIA (*A*) and 20 nM [3H]CGS21680 (*B*) to brain striatal membranes (0.3 mg of protein/ml) was performed as described in Materials and Methods, in the absence or in the presence of increasing concentrations of ADA mutants. Dose-response curves correspond to the mutants G184G (red), D185A (green), L194A (dark magenta), or *E. coli* S Φ 3838 extracts not expressing ADA (gray); human ADA wild type is represented in black (dotted curves). Data are means \pm SE from a representative experiment ($n=3$) performed in triplicates. *C, D*) Surface representations of human ADA; helix α -1 (L58-I72) is shown in white, helix α -2 (CD26 binding site, P126-D143) is in yellow, P114-N118 residues are in blue, M155-G158 residues are in green, A183-I188 residues are in red, and L194 is in orange (*D*). ADA (MMDBID:75950) was drawn with Cn3D4.1 program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

published results (27). Note that the enzymatic activity of ADA is not required to produce an increase in the agonist binding to A₁R and A_{2A}R, because Hg²⁺-inhibited ADA is able to enhance agonist binding to ARs. These results imply that Hg²⁺ binding to the enzyme gives rise to an inhibited open form of the enzyme.

The predicted complex between ADA and A_{2A}R is compatible with a supramolecular assembly in which ADA bridges A_{2A}R and CD26 (Fig. 1 C, D). This is in line with the notion that the interaction of ADA with ARs has an important role in the immunological synapse. In the immunosynapse, by interacting simultaneously with CD26 (on the surface of CD4⁺ T cells) and the AR (on the cell surface of dendritic cells), ADA triggers a costimulatory signal for human T cells that is critical in potentiating T-cell proliferation and activation (8, 10, 11). The intercellular interaction made by ARs, ADA, and CD26 increases the power of the effector phase of CD4⁺ T-cell responses and induces generation of memory and regulatory T cells (60). Thus, our results support the role of ADA as a bridge between cells expressing ARs and cells expressing CD26.

In the neurological synapse, adenosine acts as a potent neuromodulator by binding to ARs. One important effect of ADA in this process is to degrade adenosine in order to finish the receptor signaling. For many years, it had been assumed that this was the only role of ADA in ligand binding to ARs. Because of this, ADA is usually added to *in vitro* ligand binding experiments to avoid endogenous adenosine competition with AR ligands for the binding site. The first evidence that ADA also plays an enzyme-independent role on ARs came from the demonstration that ADA is able to bind A₁R, A_{2B}R, and A_{2A}R (20–26). This molecular interaction leads to a significant increase in the affinity of receptors for the agonist (21, 26). This allosteric effect was demonstrated to be independent of the enzymatic activity, because it happens with exhaustively washed membranes devoid of detectable adenosine or with inactivated ADA by pretreatment with Hg²⁺ ions (21, 24). Thus, the ecto-ADA can perform two roles. First, when the adenosine concentration is high, through its enzymatic activity, ADA reduces the available adenosine levels; thus, there is less stimulation of ARs, preventing the receptor desensitization. Second, independent from this enzymatic activity, by interacting with receptors, ADA can act as an allosteric modulator of ARs, increasing the adenosine binding at low adenosine concentrations (21, 24, 25). A new strategy to modulate the activity of GPCRs is to find allosteric modulators that are ligands able to bind to an allosteric site and increase or decrease the ligand binding to the receptor orthosteric site. By this definition, ADA is an allosteric ligand of A₁R and A_{2A}R that positively modulates the agonist binding to the orthosteric site. The allosteric modulators known so far for ARs are small organic compounds. One exception is a recently described antibody fragment that prevents agonist but not antagonist binding to A_{2A}R. Although this antibody fragment provides insights into the mechanisms of allosteric modulation

of GPCRs, the therapeutic implications are slight, since they recognize the intracellular portion of A_{2A}R (61). The allosteric interaction described here suggests a novel strategy to modulate GPCR function, which relies on small molecules acting on extracellular proteins bound to the GPCR, *i.e.*, drugs acting on ADA, which allosterically modulates the AR properties. The interest in allosteric modulators is more relevant in the case of neurotransmitter receptor targets due to the fact that synaptic neurotransmission occurs in extremely complex circuits implicated in many neurological functions. The presence of ADA bound to the cell surface of neurons has been demonstrated (62), thus reinforcing the concept that this allosteric effect of ADA is likely to occur *in vivo*. More than 70 ADA mutations have been found in patients with SCID (5), and it will be interesting to know whether some of these mutations interfere with the interaction of ADA with ARs. In this respect, it would be worth investigating whether the modulatory role of ADA on AR function is perturbed due to mutation, which would imply neurological alterations in addition to immunological alterations as associated with selected ADA SCID-causing mutations. Thus, unveiling the ADA portions involved in the interaction with the ARs may help discriminate ADA SCID mutations characterized by neurological effects from those having only immunological effects.

In summary, the results of this study led to several major conclusions on the interaction of ADA with A₁R and A_{2A}R. First, we described an A₁R and A_{2A}R allosteric modulation by an extracellular protein. In this interaction, the ADA α -1 helix containing residues L58-I72 and the loop containing residues A183-I188 are important to maintain both the catalytic efficiency of ADA and its functional interaction with both ARs. Second, the predicted interaction mode between ADA and A_{2A}R is such that a continuous channel connects the adenosine binding site on the A_{2A}R and the catalytic pocket of ADA. Third, the predicted architecture of the ADA-A_{2A}R complex is compatible with a supramolecular assembly, in which ADA acts as a bridge between A_{2A}R and CD26. This is consistent with the hypothesis that ADA may bridge dendritic cells and lymphocytes in the immunosynapse triggering costimulation. Finally, we suggest that it is the open form of ADA but not the closed one that is able to functionally interact with A₁R and A_{2A}R. In addition, our results suggest the role of ADA hydrophobic residues in maintaining the adenosine affinity and controlling the catalysis. EJ

The authors acknowledge the technical help obtained from Jasmina Jiménez (Laboratory of Molecular Neurobiology, University of Barcelona) and Francesco Raimondi (University of Modena and Reggio Emilia). This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2010-18472, SAF2011-23813 and SAF2008-3229-E/ within the frame of the Era-NET Neuron program), grant for collaborative projects PI2011/02-7 from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), and by FIPSE (a non-

profit foundation including the Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme, and Roche) grant 36750/08. This study was also supported by Telethon-Italy grant S00068TELU (to F.F.). P.J.M. is a Ramón y Cajal Fellow.

REFERENCES

- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., and Camaioni, E. (2001) Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med. Res. Rev.* **21**, 105–128
- Petersen, M. B., Tranebjaerg, L., Tommerup, N., Nygaard, P., and Edwards, H. (1987) New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13 X 11 by study of a patient with interstitial deletion 20q. *J. Med. Genet.* **24**, 93–96
- Arredondo-Vega, F. X., Santisteban, I., Daniels, S., Toutain, S., and Hershfield, M. S. (1998) Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1049–1059
- Resta, R., and Thompson, L. F. (1997) SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol. Today* **18**, 371–374
- Hershfield, M. S. (2003) Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 571–577
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**, 466–469
- Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., and Blanco, J. (1998) Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. Rev.* **161**, 27–42
- Pacheco, R., Martínez-Navio, J. M., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9583–9588
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H. U., and Brandstetter, H. (2003) The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5063–5068
- Dong, R. P., and Morimoto, C. (1996) Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation. *Hum. Cell* **9**, 153–162
- Dong, R. P., Tachibana, K., Hegen, M., Munakata, Y., Cho, D., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. (1997) Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation. *J. Immunol.* **159**, 6070–6076
- Havre, P. A., Abe, M., Urasaki, Y., Ohnuma, K., Morimoto, C., and Dang, N. H. (2008) The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front. Biosci.* **13**, 1634–1645
- Kajiyama, H., Kikkawa, F., Khin, E., Shibata, K., Ino, K., and Mizutani, S. (2003) Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* **63**, 2278–2283
- Kikkawa, F., Kajiyama, H., Ino, K., Shibata, K., and Mizutani, S. (2003) Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV. *Int. J. Cancer* **105**, 779–783
- Wesley, U. V., Albino, A. P., Tiwari, S., and Houghton, A. N. (1999) A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. *J. Exp. Med.* **190**, 311–322
- Kameoka, J., Ichinohasama, R., Inoue, H., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Tomiya, Y., Yamada, M., Ishizawa, K., Harigae, H., Sawai, T., and Sasaki, T. (2006) CD26, together with cell surface adenosine deaminase, is selectively expressed on ALK-positive, but not on ALK-negative, anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **47**, 2181–2188
- Richard, E., Arredondo-Vega, F. X., Santisteban, I., Kelly, S. J., Patel, D. D., and Hershfield, M. S. (2000) The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to cd26 but does not cause immune deficiency. *J. Exp. Med.* **192**, 1223–1236
- Richard, E., Alam, S. M., Arredondo-Vega, F. X., Patel, D. D., and Hershfield, M. S. (2002) Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J. Biol. Chem.* **277**, 19720–19726
- Weihofen, W. A., Liu, J., Reutter, W., Saenger, W., and Fan, H. (2004) Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface. *J. Biol. Chem.* **279**, 43330–43335
- Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (1996) Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* **380**, 219–223
- Gracia, E., Cortés, A., Meana, J. J., García-Sevilla, J., Hershfield, M. S., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., and Casadó, V. (2008) Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [H](R)-pia binding to the caudate nucleus. *J. Neurochem.* **107**, 161–170
- Saura, C., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (1996) Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. *J. Neurochem.* **66**, 1675–1682
- Sun, W. C., Cao, Y., Jin, L., Wang, L. Z., Meng, F., and Zhu, X. Z. (2005) Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* **26**, 160–165
- Gracia, E., Pérez-Capote, K., Moreno, E., Bakesova, J., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., Cortés, A., Casadó, V., and Canela, E. I. (2011) A2A adenosine receptor ligand binding and signaling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem. J.* **435**, 701–709
- Herrera, C., Casadó, V., Ciruela, F., Schofield, P., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2001) Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 127–134
- Saura, C. A., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (1998) Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **273**, 17610–17617
- Torvinen, M., Ginés, S., Hillion, J., Latini, S., Canals, M., Ciruela, F., Bordoni, F., Staines, W., Pedata, F., Agnati, L. F., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., and Fuxe, K. (2002) Interactions among adenosine deaminase, adenosine A(1) receptors and dopamine D(1) receptors in stably cotransfected fibroblast cells and neurons. *Neuroscience* **113**, 709–719
- Climent, N., Martínez-Navio, J. M., Gil, C., Garcia, F., Rovira, C., Hurtado, C., Miralles, L., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2009) Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV. *Immunol. Cell. Biol.* **87**, 634–639
- Martínez-Navio, J. M., Climent, N., Pacheco, R., Garcia, F., Plana, M., Nomdedeu, M., Oliva, H., Rovira, C., Miralles, L., Gatell, J. M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2009) Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation. *Immunology* **128**, 393–404
- Chen, R., Li, L., and Weng, Z. (2003) ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* **52**, 80–87
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., De Benedetti, P., Goldberg, S. R., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L. F., Woods, A. S., Ferré, S., Lluís, C., Bouvier, M., and Franco, R. (2003) Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **278**, 46741–46749
- Casciari, D., Dell'Orco, D., and Fanelli, F. (2008) Homodimerization of neurotensin 1 receptor involves helices 1, 2, and 4: insights from quaternary structure predictions and dimerization free energy estimations. *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 1669–1678
- Casciari, D., Seeber, M., and Fanelli, F. (2006) Quaternary structure predictions of transmembrane proteins starting from

- the monomer: a docking-based approach. *BMC Bioinformatics* **7**, 340
34. Fanelli, F. (2007) Dimerization of the lutropin receptor: insights from computational modeling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 260–262, 59–64
 35. Fanelli, F., Mauri, M., Capra, V., Raimondi, F., Guzzi, F., Ambrosio, M., Rovati, G. E., and Parenti, M. (2011) Light on the structure of thromboxane A2 receptor heterodimers. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3109–3120
 36. Fanelli, F., and Felline, A. (2011) Dimerization and ligand binding affect the structure network of A(2A) adenosine receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 1256–1266
 37. Heyer, L. J., Kruglyak, S., Yooseph, S. (1999) Exploring expression data: identification and analysis of coexpressed genes. *Genome Res.* **9**, 1106–1115
 38. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G., and Tate, C. G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature* **474**, 521–525
 39. Kinoshita, T., Nishio, N., Nakanishi, I., Sato, A., and Fujii, T. (2003) Structure of bovine adenosine deaminase complexed with 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside. *Acta Crystallogr. A* **59**, 299–303
 40. Kinoshita, T., Nakanishi, I., Terasaka, T., Kuno, M., Seki, N., Warizaya, M., Matsumura, H., Inoue, T., Takano, K., Adachi, H., Mori, Y., and Fujii, T. (2005) Structural basis of compound recognition by adenosine deaminase. *Biochemistry* **44**, 10562–10569
 41. Cieplak, P., and Kollman, P. A. (1996) A technique to study molecular recognition in drug design: preliminary application of free energy derivatives to inhibition of a malarial cysteine protease. *J. Mol. Recognit.* **9**, 103–112
 42. Lu, H., and Schulten, K. (1999) Steered molecular dynamics simulations of force-induced protein domain unfolding. *Proteins* **35**, 453–463
 43. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L., and Schulten, K. (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **26**, 1781–1802
 44. York, D. M., Wlodawer, A., Pedersen, L. G., and Darden, T. A. (1994) Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8715–8718
 45. van Gunsteren, W. F., and Berendsen, H. J. (1987) Thermodynamic cycle integration by computer simulation as a tool for obtaining free energy differences in molecular chemistry. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1**, 171–176
 46. Chandler, D., Weeks, J. D., and Andersen, H. C. (1983) Van der Waals picture of liquids, solids, and phase transformations. *Science* **220**, 787–794
 47. Rueda, M., Ferrer-Costa, C., Meyer, T., Perez, A., Camps, J., Hospital, A., Gelpí, J.L., and Orozco, M. (2007) A consensus view of protein dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 796–801
 48. Meyer, T., D'Abramo, M., Hospital, A., Rueda, M., Ferrer-Costa, C., Pérez, A., Carrillo, O., Camps, J., Fenollosa, C., Repchevsky, D., Gelpí, J.L., and Orozco, M. (2010) MoDEL (Molecular Dynamics Extended Library): a database of atomistic molecular dynamics trajectories. *Structure* **18**, 1399–1409
 49. Fernández-Recio, J., Totrov, M., Skorodumov, C., and Abagyan, R. (2005) Optimal docking area: a new method for predicting protein-protein interaction sites. *Proteins* **58**, 134–143
 50. Cheng, T. M., Blundell, T. L., and Fernández-Recio, J. (2007) pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking. *Proteins* **68**, 503–511
 51. Chang, Z. Y., Nygaard, P., Chinault, A. C., Kellems, R. E. (1991) Deduced amino acid sequence of Escherichia coli adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry* **30**, 2273–2280
 52. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85
 53. Casadó, V., Cantí, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., and Franco, R. (1990) Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* **26**, 461–473
 54. Wang, Z., and Quijochó, F. A. (1998) Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity. *Biochemistry* **37**, 8314–8324
 55. Wilson, D. K., and Quijochó, F. A. (1993) A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochemistry* **32**, 1689–1694
 56. Wilson, D. K., Rudolph, F. B., and Quijochó, F. A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* **252**, 1278–1284
 57. Kinoshita, T., Tada, T., and Nakanishi, I. (2008) Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 53–57
 58. Terasaka, T., Kinoshita, T., Kuno, M., and Nakanishi, I. (2004) A highly potent non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor: efficient drug discovery by intentional lead hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 34–35
 59. Larson, E. T., Deng, W., Krumm, B. E., Napuli, A., Mueller, N., Van Voorhis, W. C., Buckner, F. S., Fan, E., Lauricella, A., DeTitta, G., Luft, J., Zucker, F., Hol, W. G., Verlinde, C. L., and Merritt, E. A. (2008) Structures of substrate- and inhibitor-bound adenosine deaminase from a human malaria parasite show a dramatic conformational change and shed light on drug selectivity. *J. Mol. Biol.* **381**, 975–988
 60. Martínez-Navío, J. M., Casanova, V., Pacheco, R., Naval-Macabuhay, I., Climent, N., García, F., Gatell, J. M., Mallol, J., Gallart, T., Lluís, C., and Franco, R. (2011) Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 127–136
 61. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A. D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Iwata, S., and Murata, T. (2012) G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* **482**, 237–240
 62. Ruíz, M. A., Escriche, M., Luís, C., Franco, R., Martín, M., Andrés, A., and Ros, M. (2000) Adenosine A(1) receptor in cultured neurons from rat cerebral cortex: colocalization with adenosine deaminase. *J. Neurochem.* **75**, 656–664
 63. Harris, R., Olson, A. J., and Goodsell, D. S. (2008) Automated prediction of ligand-binding sites in proteins. *Proteins* **70**, 1506–1517
 64. Frishman, D., and Argos, P. (1995) Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **23**, 566–579

Received for publication July 2, 2012.
Accepted for publication November 13, 2012.

3.2 La cocaína a través de heterómeros de receptores sigma-1 y D₂ de dopamina inhibe la señalización del receptor D₂.

Gemma Navarro¹, Estefanía Moreno¹, Jordi Bonaventura¹, Marc Brugarolas¹, Daniel Farré¹, David Aguinaga¹, Josefa Mallol¹, Antoni Cortés¹, Vicent Casadó¹, Carme Lluís¹, Sergi Ferré², Rafael Franco³, Enric I. Canela¹, Peter J. McCormick¹

1 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) y Instituto de Biomedicina de la Universidad de Barcelona (IBUB) y Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

2 National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, USA

3 Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, España

☉ Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Manuscrito publicado en PLoS One 2013 Apr 18 ; 8(4): e61245

Bajo condiciones normales, el cerebro mantiene un delicado balance entre los *inputs* del sistema de la búsqueda de la recompensa regulado por neuronas que presentan receptores de dopamina de la familia D_{1-like}, y los *inputs* del sistema de aversión, controlado por neuronas que contienen receptores de dopamina de la familia D_{2-like}. La cocaína es capaz de subvertir este balance alterando la señalización celular de estas dos vías de tal manera que acaba dominando el sistema de búsqueda de la recompensa a través del receptor D₁. En el estudio del efecto de la cocaína sobre la funcionalidad del receptor D₂ de dopamina, presentado en este trabajo, demostramos la interacción molecular y funcional del receptor σ_1 con los receptores D₂ de dopamina. Mediante aproximaciones biofísicas y bioquímicas, hemos descubierto que los receptores D₂ de dopamina (la isoforma larga del receptor D₂) pueden formar heterómeros con los receptores σ_1 , siendo esta interacción específica de los receptores D₂, ya que otros miembros de la familia de receptores D_{2-like}, D₃ y D₄, no forman heterómeros. Los heterómeros sigma-1-D₂ están constituidos por oligómeros de orden superior, con una estructura mínima de heterotetrámeros, σ_1 - σ_1 -D₂-D₂. Hemos demostrado que los heterómeros σ_1 -D₂ se expresan en estriado de ratón y se demuestra que la cocaína, a través de la unión a los heterómeros σ_1 -D₂, inhibe la señalización de los receptores D₂ tanto en cultivos celulares como en estriado de ratón. En contraste, en el estriado de animales *knockout* de σ_1 estos complejos no se encuentran y no se produce esta

inhibición. En conjunto, todos estos resultados proporcionan un nuevo mecanismo por el cual la cocaína puede disminuir la señalización de la vía indirecta (neuronas que expresan el receptor D₂) alterando el delicado balance en la señalización que influye en el mecanismo de la búsqueda de la droga, implicando las neuronas que expresan receptores D₁ y D₂ en el cerebro.

Cocaine Inhibits Dopamine D₂ Receptor Signaling via Sigma-1-D₂ Receptor Heteromers

Gemma Navarro¹, Estefania Moreno¹, Jordi Bonaventura¹, Marc Brugarolas¹, Daniel Farré¹, David Aguinaga¹, Josefa Mallol¹, Antoni Cortés¹, Vicent Casadó¹, Carmen Lluís¹, Sergi Ferre², Rafael Franco^{3,9}, Enric Canela^{1,9}, Peter J. McCormick^{1*,9}

1 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) and Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB) and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, United States of America, **3** Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

Abstract

Under normal conditions the brain maintains a delicate balance between inputs of reward seeking controlled by neurons containing the D₁-like family of dopamine receptors and inputs of aversion coming from neurons containing the D₂-like family of dopamine receptors. Cocaine is able to subvert these balanced inputs by altering the cell signaling of these two pathways such that D₁ reward seeking pathway dominates. Here, we provide an explanation at the cellular and biochemical level how cocaine may achieve this. Exploring the effect of cocaine on dopamine D₂ receptors function, we present evidence of σ_1 receptor molecular and functional interaction with dopamine D₂ receptors. Using biophysical, biochemical, and cell biology approaches, we discovered that D₂ receptors (the long isoform of the D₂ receptor) can complex with σ_1 receptors, a result that is specific to D₂ receptors, as D₃ and D₄ receptors did not form heteromers. We demonstrate that the σ_1 -D₂ receptor heteromers consist of higher order oligomers, are found in mouse striatum and that cocaine, by binding to σ_1 -D₂ receptor heteromers, inhibits downstream signaling in both cultured cells and in mouse striatum. In contrast, in striatum from σ_1 knockout animals these complexes are not found and this inhibition is not seen. Taken together, these data illuminate the mechanism by which the initial exposure to cocaine can inhibit signaling via D₂ receptor containing neurons, destabilizing the delicate signaling balance influencing drug seeking that emanates from the D₁ and D₂ receptor containing neurons in the brain.

Citation: Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, Brugarolas M, Farré D, et al. (2013) Cocaine Inhibits Dopamine D₂ Receptor Signaling via Sigma-1-D₂ Receptor Heteromers. PLoS ONE 8(4): e61245. doi:10.1371/journal.pone.0061245

Editor: Stefan Strack, University of Iowa, United States of America

Received: November 5, 2012; **Accepted:** March 8, 2013; **Published:** April 18, 2013

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

Funding: This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2009-07276, SAF2010-18472, SAF2011-23813), and by Intramural Funds of the National Institute on Drug Abuse to SF. PJM is a Ramón y Cajal Fellow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pmccormick@ub.edu

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

The striatum is the main input structure of the basal ganglia and consists of subcortical structures involved in the processing of information related with the performance and learning of complex motor acts and motivational processes and is altered in conditions such as Parkinson's, Huntington's and in drug addiction [1]. GABAergic striatal efferent neurons constitute more than 95% of the striatal neuronal population [2]. There are two major subtypes of GABAergic striatal efferent neurons: GABAergic dynorphinergic neurons, which express the peptide dynorphin and dopamine D₁ receptors and GABAergic enkephalinergic neurons, which express the peptide enkephalin and dopamine D₂ receptors [3]. In the case of drug addiction, and specifically cocaine, the dopaminergic pathway plays a critical role in the pathology [4,5], specifically, the two populations of D₁ and D₂ containing neurons. These two pathways can control novelty seeking and reward-dependent learning as well as having opposite effects on motor activity [6]. Early studies performed in D₁ receptor

knockout mice showed the importance of dopamine D₁ receptor in cocaine action as the activation of D₁ receptors was an absolute requirement for the induction of the cellular and behavioral responses to cocaine [7]. In addition to opposing the locomotor effects of D₁, D₂ containing neurons also serve to oppose drug reinforcement [8]. In the context of cocaine it is known that the D₂ is essential for cocaine's effects [9] as D₂ receptors are required to enhance the rewarding properties of cocaine [10]. In D₂ -/- mutant animals the release of dopamine evoked by cocaine injection is dramatically higher compared to WT animals, and an intact D₂-mediated signaling is required to elicit the rewarding and reinforcing effects of cocaine [11]. At the mechanistic level it was shown there is a switch from D₂ to a D₁ mediated increase on GABA_A-IPSC in cocaine treated rats [12], and in models of long-term cocaine treatment it has been shown that D₁ increases and D₂ levels decrease [13]. Finally, it has been shown that the activation of postsynaptic D₂ on striatopallidal neurons can facilitate drug reinforcement via inhibition of these neurons [8]. All of these studies point to a balance between D₁ and D₂ in

controlling the motivational processes and reinforcement in drugs of abuse, and specifically cocaine.

The initial mechanistic steps of cocaine binding and its effects on these two striatal populations of neurons (D₁ and D₂ receptor containing neurons) are not well understood. What is known is cocaine is able to exert part of its behavioral and cellular effect by elevating dopamine levels in the striatum [14]. It achieves this by binding to and inhibiting the presynaptic dopamine transporter (DAT) [15]. Cocaine is a high-affinity inhibitor of DAT and upon binding to DAT cocaine causes a rapid increase in extracellular dopamine levels. Although DAT inhibition is required for cocaine's effects, it is not the only required mechanism of action per the effects of D₁ and D₂ receptors discussed above. In fact, Cocaine is able to modulate dopamine signaling, via both the D₁ and D₂ family of dopamine receptors, which when activated can lead to stimulation or inhibition of signaling pathways. This provokes the question, how does cocaine seemingly influence two different receptor pathways? One potential answer lies in the fact that cocaine does not seem to bind the dopamine receptors directly but can bind to a receptor heteromer made up of the D₁-like receptor family member, D₁ and the σ_1 -receptor [16]. Through this latter interaction, cocaine can potentiate D₁ receptor-mediated adenylyl cyclase activation, induce ERK1/2 phosphorylation and counteract the MAPK activation induced by D₁ receptor stimulation [16]. However, as discussed above, D₂ also plays a role in the early effects of cocaine. Here we explore the initial molecular events after cocaine exposure on the dopamine receptor D₂ like family and test the hypothesis that σ_1 receptor may provide the link between cocaine and the D₁ and D₂ receptor signaling balance.

Materials and Methods

Ethics Statement

The study received the approval of the Catalan Ethical Committee for Animal Use (CEAA/DMAH 4049 and 5664) and all procedures were performed to minimize animal suffering.

Fusion Proteins and Expression Vectors

Sequences encoding amino acids residues 1–155 and 155–238 of YFP Venus protein, and amino acids residues 1–229 and 230–311 of RLuc8 protein were subcloned in pcDNA3.1 vector to obtain the YFP Venus (nVenus, cVenus) and RLuc8 (nRLuc8, cRLuc8) hemi-truncated proteins expressed in pcDNA3.1 vector. The human cDNA for the long isoform of dopamine D₂ receptors (D₂ receptors), adenosine A_{2A} or σ_1 receptors cloned in pcDNA3.1 were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring either unique *EcoRI* and *BamHI* sites (or *EcoRI* and *KpnI* sites for σ_1 receptor). The fragments were then subcloned to be in-frame with Rluc, EYFP or GFP² into the *EcoRI* and *BamHI* or *KpnI* restriction site of an Rluc-expressing vector (pRLuc-N1, PerkinElmer, Wellesley, MA), an EYFP expressing vector (EYFP-N3; enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany) or an GFP² expressing vector (GFP²-N2, Clontech) respectively, to give the plasmids that express receptors fused to either RLuc, YFP or GFP² on the C-terminal end of the receptor (D₂-RLuc, D₂-YFP, D₂-GFP², σ_1 -RLuc, σ_1 -YFP, A_{2A}-RLuc or A_{2A}-YFP receptors respectively). The human cDNAs for D₂ and σ_1 receptors cloned in pcDNA3.1 were amplified without its stop codon using sense and antisense primers harboring unique *KpnI* and *EcoRI* sites to clone D₂ and σ_1 receptors in pcDNA3.1-cVenus, pcDNA3.1-nVenus, pcDNA3.1-cRLuc8 or pcDNA3.1-nRLuc8. The amplified fragments were subcloned to be in-frame with the multiple cloning sites of the vectors to give the plasmids

that express D₂ and σ_1 receptors fused to either nVenus, cVenus, nRLuc8 or cRLuc8 on the C-terminal end of the receptor (D₂-cVenus, D₂-nVenus, D₂-cRLuc8, D₂-nRLuc8, σ_1 -nVenus, σ_1 -cVenus, σ_1 -nRLuc8 or σ_1 -cRLuc8, respectively). When analyzed by confocal microscopy, it was observed that all fusion proteins showed similar subcellular distribution than naive receptors (see results and results not shown). Fusion of RLuc and YFP to D₂ or A_{2A} receptors did not modify receptor function as previously determined by cAMP assays [17].

Cell Culture and Chemical Reagents

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 5% (v/v) heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). CHO cell lines were maintained in α -MEM medium without nucleosides, containing 10% fetal calf serum, 50 μ g/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (300 μ g/mL). Cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂, and were passaged when they were 80–90% confluent, i.e. approximately twice a week. HEK-293T or CHO cells were transiently transfected with the corresponding cDNAs by PEI (PolyEthylenImine, Sigma, St. Louis, MO, USA) method as previously described [18] or the corresponding siRNA by lipofectamine (InvitrogenTM, Carlsbad, USA) method following the instructions of the supplier. siRNA that targets both human and rodent σ_1 RNA and a scrambled control siRNA were purchased from Invitrogen (catalog HSS 145543). All ligands used are diagrammed in Figure S1. Cocaine-HCl was purchased from Spanish Agencia del Medicamento n^o: 2003C00220. PD144418 and PRE were purchased from Tocris, Bristol, UK. Quinpirole and raclopride were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Immunocytochemistry

For immunocytochemistry, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. Then, after permeabilization with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were treated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, cells were labeled with the primary mouse monoclonal anti-Rluc receptor antibody (1/200, Millipore, CA, USA) or mouse monoclonal anti- σ_1 receptor antibody (1/200; Chemicon) for 1 h, washed, and stained with the secondary Cy3 donkey anti-mouse antibody (1/200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). D₂ receptors fused to YFP protein were detected by their fluorescence properties. Samples were rinsed and observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

BRET and BRET with BiFC Assays

HEK-293T cells growing in six-well plates were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for the receptor fused to RLuc or nRLuc8 and cRLuc8 proteins and with increasingly amounts of cDNA corresponding to the receptor fused to YFP or nVenus and cVenus proteins (see figure legends). To quantify receptor-YFP expression or receptor-reconstituted YFP Venus expression, cells (20 μ g protein) were distributed in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and fluorescence was read in a Fluoro Star Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter at 400 nm reading. Receptor-fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing the BRET donor alone. For BRET or BRET with

BiFC measurements, the equivalent of 20 μ g of cell suspension were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates; Sigma) and 5 μ M coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. After 1 minute for BRET or after 5 min for BRET with BiFC of adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440–500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510–590 nm). To quantify receptor-RLuc or receptor-reconstituted RLuc8 expression luminescence readings were also performed after 10 minutes of adding 5 μ M coelenterazine H. Both fluorescence and luminescence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 150,000 luminescent units) while monitoring the increase acceptor expression (10,000–70,000 fluorescent units). 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. BRET is expressed as mili BRET units, mBU (net BRET \times 1000).

SRET Assays

HEK-293T cells growing in six-well plates were transiently co-transfected with constant amounts of cDNAs encoding for both receptor fused to RLuc and GFP² proteins and with increasingly amounts of cDNA corresponding to the receptor fused to YFP protein and SRET was determined as previously described using a Mithras LB 40 [19].

Striatal Slices Preparation

Brains from WT littermates and σ_1 receptor KO CD1 albino Swiss male mice (8 weeks old, 25 g of weight) were generously provided by Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain) [20]. Brains were rapidly removed from animals and striatal slices were obtained as previously indicated [16,21].

Coimmunoprecipitation

Striatal slices from WT littermates and σ_1 receptor KO mice were treated with medium or with 150 μ M cocaine for 30 min. The striatal tissue was disrupted with a Polytron homogenizer in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (1/1000, Sigma). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000 g for 1 h at 4°C. Membranes were solubilized in ice-cold immunoprecipitation buffer (phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% (v/v) Nonidet P-40) and incubated for 30 min on the ice before centrifugation at 105,000 g for 1 h at 4°C. The supernatant (1 mg/ml of protein) was processed for immunoprecipitation as described in the immunoprecipitation protocol using a Dynabeads[®] Protein G kit (Invitrogen) using goat anti-D₂ receptor antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). As negative control anti-FLAG antibody (1:1000, Sigma) was used. Protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce) using bovine serum albumin dilutions as standards. Immunoprecipitates were separated on a denaturing 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes. Membranes were blocked for 90 min in 5% Bovine (1% fat) dry milk and PBS-Tween 20 (0.05% V/V). The following primary antibodies were incubated overnight at 4°C in 5% milk and PBS-Tween 20 (0.05% V/V): mouse anti-D₂ receptor antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or mouse anti- σ_1 receptor antibody B-5 (sc-137075) (1:800, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and, after washing three times for 10 min in PBS

Tween-20 (0.05% V/V), membranes were incubated with the secondary antibody rabbit anti-mouse-HRP (1:20,000, Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature in 5% milk and PBS-Tween 20 (0.05% V/V). After three washes with PBS Tween-20 (0.05% V/V) and a final wash with PBS, bands were detected with the addition of SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) and visualized with a LAS-3000 (Fujifilm). Analysis of detected bands was performed by Image Gauge software (version 4.0) and Multi Gauge software (version 3.0).

In Situ Proximity Ligation Assays (PLA)

Striatal slices from WT and σ_1 receptor KO mice treated or not with 150 μ M cocaine for 30 min, were mounted on slide glass and heteromers were detected using the Duolink II in situ PLA detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden). Slices were thawed at 4°C, washed in 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized with TBS containing 0.01% Triton X-100 for 10 min and successively washed with TBS. After 1 h incubation at 37°C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber, slices were incubated overnight in the antibody diluent medium with a mixture of equal amounts of the primary antibodies mouse anti- σ_1 receptor antibody B-5 (sc-137075, 1:500, see above) and the guinea-pig anti-D₂ receptor antibody (1:500 Sigma) which specificity for D₂ receptors was previously demonstrated [21]. Slices were washed as indicated by the supplier and incubated for 2 h in a pre-heated humidity chamber at 37°C with PLA probes detecting mouse or guinea pig antibodies, Duolink II PLA probe anti-mouse plus and Duolink II PLA probe anti-guinea minus (prepared following the instructions of the supplier) diluted in the antibody diluent to a concentration of 1:5. After washing at room temperature, slices were incubated in a pre-heated humidity chamber for 30 min at 37°C, with the ligation solution (Duolink II Ligation stock 1:5 and Duolink II Ligase 1:40). Detection of the amplified probe was done with the Duolink II Detection Reagents Red Kit. After exhaustively washing at room temperature as indicated in the kit, slices were mounted using the mounting medium with DAPI. The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Images were opened and processed with Image J confocal.

Immunohistochemistry

Striatal slices from WT and σ_1 receptor KO mice were thawed at 4°C, washed in TBS, permeabilized with TBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min and successively washed with TBS. Slices were rocked in Blocking reagent 1% (Roche, Sant Cugat del Vallés, Spain) for 1 h at 37°C in a humidified atmosphere and incubated overnight at 4°C in a humidified atmosphere with the primary antibodies: mouse anti- σ_1 receptor antibody B-5 (sc-137075, 1:100, see above) or the guinea-pig anti-D₂ receptor antibody (1:100 Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan), in 0.1% TBS-Tween, 0.1% BSA-Acetylated (Aurion, Wageningen, The Netherlands), 7% SND. Slices were washed in TBS-Tween 0.05% and left for 2 h at room temperature in a humidified atmosphere with the corresponding secondary antibodies: goat anti-mouse (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen) and goat anti-guinea pig (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen) in the same medium. Then, the slices were washed in TBS-Tween 0.05%, followed by a single wash in TBS before mounting in Mowiol medium (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), covered with a glass and left to dry at 4°C for 24 h. The sections were observed and imaged in a Leica SP2 confocal microscope.

cAMP Determination

Non transfected or transiently transfected CHO cells (see figure legends) were treated for 10 min with the indicated concentrations of D₂ receptor agonist quinpirole, 30 μ M cocaine or 100 nM of the σ_1 receptor agonist PRE-084 alone or in combination. cAMP production was determined using [³H]cAMP kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) following the instructions from the manufacturer.

ERK 1/2 Phosphorylation Assays

WT and KO ice striatal slices were treated for the indicated time with the indicated concentrations of cocaine and/or D₂ receptor ligands, frozen on dry ice and stored at -80°C . When ERK1/2 phosphorylation assays were performed in cell cultures, CHO cells (48 h after transfection) were cultured in serum-free medium for 16 h before the addition of the indicated concentration of cocaine or/and D₂ receptor ligands for the indicated time. Both, cells and slices were lysed in 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) and ERK 1/2 phosphorylation was determined as indicated elsewhere [16,22].

CellKey Label-free Assays

The CellKey system provides a universal, label-free, cell-based assay platform that uses cellular dielectric spectroscopy (CDS) to measure endogenous and transfected receptor activation in real time in live cells [23]. Changes in the complex impedance (DZ or dZ) of a cell monolayer in response to receptor stimulation were measured. Impedance (Z) is defined by the ratio of voltage to current as described by Ohm's law ($Z = V/I$). CHO cell clones stably expressing D₂ receptors were grown to confluence in a CellKey Standard 96 well microplate that contains electrodes at the bottom of each well. For untreated cells or for cells preincubated (overnight at 37°C) with PTx (10 ng/ml), medium was replaced by HBSS buffer (Gibco) supplemented with 20 mM HEPES 30 minutes prior to running the cell equilibration protocol. A baseline was recorded for 5 minutes and then cells were treated with increasing concentrations of the D₂ receptor agonist quinpirole or cocaine alone or in combination and data was acquired for the following 10 minutes. To calculate the impedance, small voltages at 24 different measurement frequencies were applied to treated or non-treated cells. At low frequencies, extracellular currents (iec) that pass around individual cells in the layer were induced. At high frequencies, transcellular currents (itc) that penetrate the cellular membrane were induced and the ratio of the applied voltage to the measured current for each well is the impedance. The data shown refer to the maximum complex impedance induced extracellular currents (Ziec) response to the ligand addition.

Results

σ_1 Receptors form Heteromers with Dopamine D₂ Receptors but not with the Other D₂-like Receptor Family Members

We first examined whether the receptors of the D₂-like family could directly interact with σ_1 receptors and thus be a target for cocaine binding. To do this we used the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) technology in HEK-293T cells expressing a constant amount of D₂ (long isoform), D₃ or D₄ dopamine receptors fused to *Renilla Luciferase* (RLuc) and increasing amounts of σ_1 receptors fused to Yellow Fluorescence

Protein (YFP). Clear BRET saturation curves were obtained in cells expressing D₂-RLuc receptors and increasing amounts of σ_1 -YFP receptors with a BRET_{max} of 55 ± 7 mBU and a BRET₅₀ of 28 ± 6 (Fig. 1a). In contrast, in cells expressing D₃-RLuc or D₄-RLuc and σ_1 -YFP receptors a low and linear non-specific BRET signal was obtained thus confirming the specificity of the interaction between D₂-RLuc and σ_1 -YFP receptors (Fig. 1b). As a further control, cells were cotransfected with σ_1 -YFP receptors and adenosine A_{2A}-RLuc receptors and no specific BRET signal was obtained (Fig. 1a). These results indicate that σ_1 receptors selectively interact with dopamine D₂ receptors and not with the other members of the D₂-like receptor family.

The σ_1 receptors are predominantly found in the endoplasmic reticulum membrane and the plasma membrane [24] with one hypothesis that it may be acting as a chaperone protein [25]. The expression of σ_1 and D₂ receptors at the plasma membrane level was explored by analyzing the co-localization of both receptors by confocal microscopy. HEK-293T cells were used in the assays since they constitutively express σ_1 receptors, but not DAT [16]. As expected, a punctate σ_1 receptor staining in naïve (Fig. 1c left panels, top images) or cocaine-treated (Fig. 1c right panels, top images) HEK-293T cells was detected. After transfection of the cDNA corresponding to D₂ receptors, a co-localization of σ_1 receptor and D₂ receptors was detected at the plasma membrane level in cells not treated with cocaine (Fig. 1c left panels, bottom images) or in cells treated with 30 μ M cocaine for 30 min (Fig. 1c right panels, bottom images).

Higher Order Complex Formation between σ_1 Receptors and Dopamine D₂ Receptors

Recent crystal structures have demonstrated that homodimers of GPCRs are possible, a fact that has been confirmed for dopamine D₂ receptors [26–30]. Considering that σ_1 may act as a chaperone like molecule we investigated the possible formation of higher order receptor complexes between σ_1 and D₂ receptor homomers. To test this we first needed to know whether σ_1 -receptors could form dimers, something that had not been reported. First, we tested if σ_1 receptors can form dimers by BRET experiments in HEK-293T cells expressing a constant amount of σ_1 -RLuc receptors and increasing amounts of σ_1 -YFP receptors. A positive and saturable BRET signal was obtained with a BRET_{max} of 165 ± 35 mBU and a BRET₅₀ of 22 ± 12 (Fig. 2a) indicating that σ_1 - σ_1 homodimers can exist and demonstrating, for the first time, the oligomerization of σ_1 receptors. Next, we tested whether D₂ receptor homomers could interact with σ_1 -receptors by a combined BRET and FRET assay termed Sequential Resonance Energy Transfer (SRET) [19]. This assay involves two sequential energy transfer events, one bioluminescent energy transfer between RLuc and a blue shifted GFP² and a second fluorescent energy transfer event between excited GFP² and YFP (see Fig. 2b top scheme). In HEK-293T cells expressing a constant amount of D₂-RLuc and D₂-GFP² receptors and increasing amounts of σ_1 -YFP receptors, a net SRET saturation curve was obtained with a SRET_{max} of 269 ± 33 SU and a SRET₅₀ of 92 ± 24 (Fig. 2b). Cells expressing constant amounts of adenosine A_{2A}-RLuc and A_{2A}-GFP² receptors and increasing amounts of σ_1 -YFP receptors provided very low and linear SRET, according to the lack of interaction between A_{2A} receptors and σ_1 receptors. These results demonstrate that σ_1 receptors are able to form heteromers with D₂-D₂ receptor homomers. A net SRET saturation curve was also obtained using HEK-293T cells expressing constant amounts of σ_1 -RLuc and D₂-GFP² and increasing amounts of σ_1 -YFP (SRET_{max}: 140 ± 8 SU; SRET₅₀: 9 ± 3) but not when D₂-RLuc and D₂-GFP² receptors were

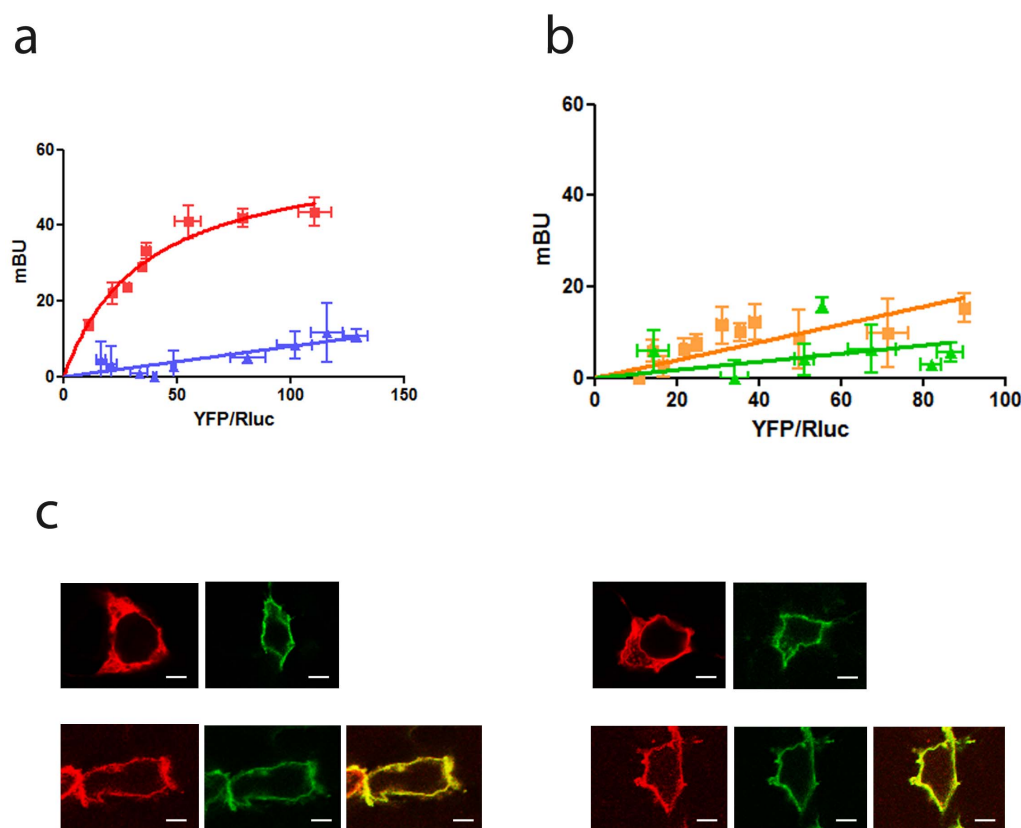


Figure 1. Molecular interaction between σ_1 receptors and D₂ receptors in living cells. BRET saturation experiments were performed with HEK-293T cells co-transfected with: (a) D₂-RLuc cDNA (0.4 μ g, squares) or adenosine A_{2A}-RLuc cDNA as negative control (0.2 μ g, triangles) and increasing amounts of σ_1 -YFP cDNA (0.1 to 1 μ g cDNA), (b) D₃-RLuc cDNA (0.5 μ g, squares) or D₄-RLuc cDNA (0.5 μ g, triangles) and increasing amounts of σ_1 -YFP cDNA (0.1 to 1 μ g cDNA). The relative amount of BRET acceptor is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor minus the fluorescence detected in cells only expressing the donor, and the luciferase activity of the donor (YFP/RLuc). BRET data are expressed as means \pm S.D. of five to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor. In (c) confocal microscopy images of HEK-293T cells transfected with D₂-YFP or σ_1 -RLuc (top panels) or co-transfected with D₂-YFP and σ_1 -RLuc (bottom panels), treated (right images) or not (left images) with 30 μ M cocaine for 30 min. σ_1 receptors (red) were identified by immunocytochemistry and D₂ receptors (green) were identified by its own fluorescence. Co-localization is shown in yellow. Scale bar: 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0061245.g001

replaced by A_{2A}-RLuc and A_{2A}-GFP² receptors (Fig. 2c). These results demonstrate that D₂ receptors are able to form heteromers with σ_1 - σ_1 receptor homomers. Finally, we tested for a higher order interaction of receptor heteromers constituted by σ_1 and D₂ receptor homomers (σ_1 - σ_1 -D₂-D₂). This was done using a modified BRET assay that involves a double complementation assay [30]. A diagram showing the BRET with luminescence/fluorescence complementation approach (BRET with BiFC assay; see Methods) is shown in Figure 2d (top panel). Briefly, one receptor fused to the N-terminal fragment (nRluc8) and another receptor fused to the C-terminal fragment (cRluc8) of the Rluc8 act as BRET donor after Rluc8 reconstitution by a close receptor-receptor interaction and one receptor fused to an YFP Venus N-terminal fragment (nVenus) and another receptor fused to the YFP Venus C-terminal fragment (cVenus), act as BRET acceptor after YFP Venus reconstitution by a close receptor-receptor interaction. Accordingly, cells were co-transfected with a constant amount of the two cDNAs corresponding to D₂-nRLuc8 and D₂-cRLuc8 (equal amounts of the two cDNAs) and with a constant amount of the two cDNAs corresponding to σ_1 -nVenus and σ_1 -cVenus (equal amounts of the two cDNAs). Specific BRET would only be possible if RLuc reconstituted by D₂-nRLuc8-D₂-cRLuc8 dimerization is close enough to YFP Venus reconstituted by σ_1 -

nVenus- σ_1 -cVenus dimerization. Higher order heterotetramers were in fact observed as evidenced by a positive BRET signal (Fig. 2d). As negative controls, cells expressing only three fusion proteins and the fourth receptor not fused provided neither a significant fluorescent signal nor a positive BRET (Figure 2d). Collectively these results indicate that σ_1 -D₂ receptor heteromers seem to be constituted by the interaction of receptor homomers and the minimal structural unit is the σ_1 - σ_1 -D₂-D₂ receptor heterotetramer.

The Effect of σ_1 Receptor Ligands on σ_1 -D₂ Receptor Heterotetramer

It is known that cocaine can bind to σ_1 [25,31,32]. We sought to measure the effect of cocaine binding to σ_1 receptors on σ_1 -D₂ receptor heteromers using BRET. We performed BRET experiments in HEK-293T cells expressing a constant amount of D₂-RLuc receptors and increasing amounts of σ_1 -YFP receptors in the presence or in the absence of cocaine. The BRET saturation curve was reduced when cells were treated for 30 min with 30 μ M of cocaine (BRET_{max}: 35 \pm 6 mBU; BRET₅₀: 26 \pm 8) indicating that cocaine binding to σ_1 receptors induces structural changes in the σ_1 -D₂ receptor heteromer. The cells treated (10 min) with the σ_1 agonist PRE084 (100 nM; BRET_{max}: 40 \pm 8 mBU; BRET₅₀:

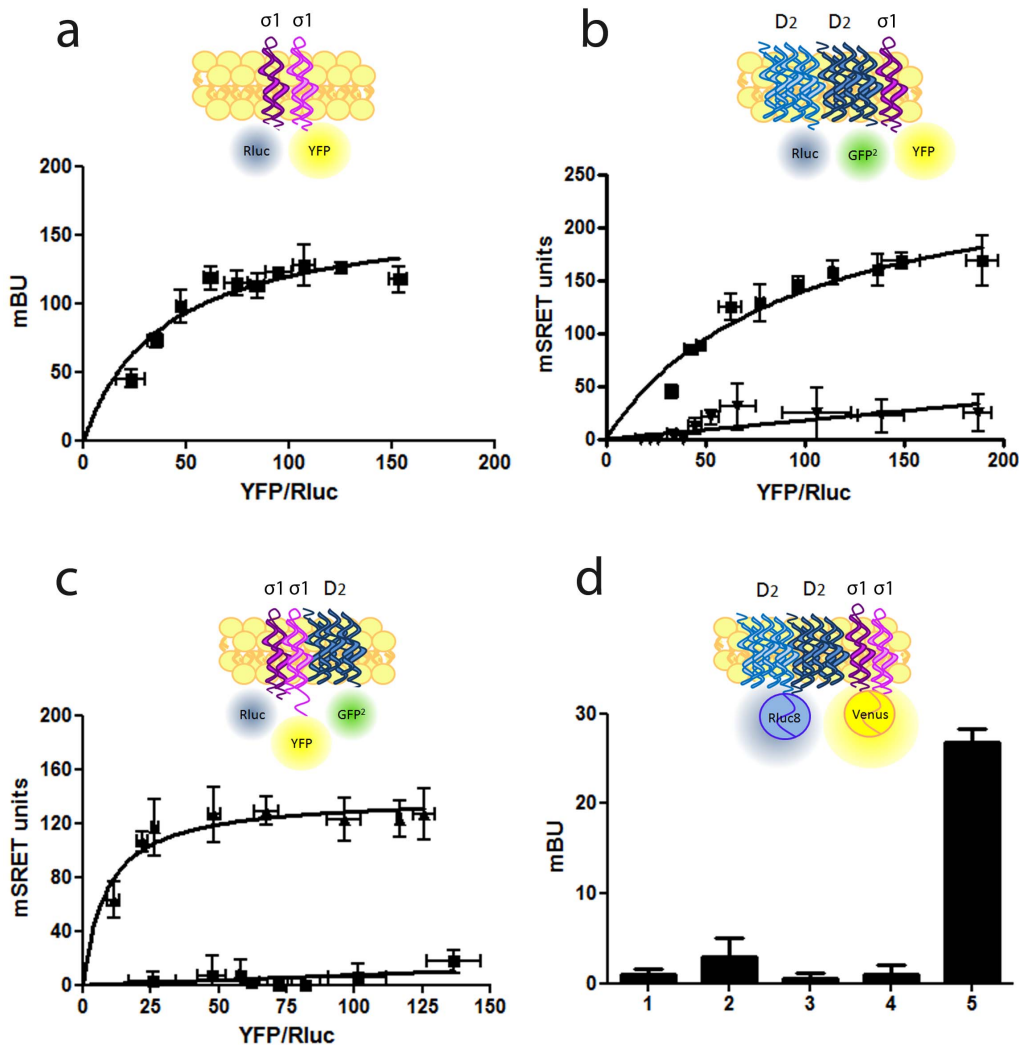


Figure 2. Higher order complex formation between σ_1 receptors and dopamine D₂ receptors in living cells. In (a) BRET saturation experiments were performed with HEK-293T cells co-transfected with σ_1 -RLuc cDNA (0.2 μ g) and increasing amounts of σ_1 -YFP cDNA (0.1 to 0.6 μ g cDNA). A schematic representation of a BRET process is shown at top in which the receptor fused to RLuc acts as donor and the receptor fused to YFP acts as acceptor. In (b) and (c) SRET saturation experiments were performed with HEK-293T cells co-transfected with: (b) a constant amount of D₂-RLuc (0.6 μ g) and D₂-GFP² (1 μ g) receptor cDNA (squares) or A_{2A}-RLuc (0.3 μ g) and A_{2A}-GFP² (0.5 μ g) receptor cDNA, as negative control (triangles), and increasing amounts of σ_1 -YFP receptor (0.2 to 1.5 μ g cDNA), (c) a constant amount of σ_1 -RLuc (0.3 μ g) and D₂-GFP² (1 μ g) (triangles) or A_{2A}-GFP² (0.5 μ g) as negative control (squares) receptor cDNA and increasing amounts of σ_1 -YFP receptor cDNA (0.2 to 1.5 μ g). The relative amount of acceptor is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor minus the fluorescence detected in cells only expressing the donor, and the luciferase activity of the donor (YFP/RLuc). A schematic representation of a SRET process is shown at top images in which two sequential energy transfer events between RLuc and GFP² (BRET process) and between GFP² and YFP (FRET process) occurs. In (d) BRET with luminescence/fluorescence complementation approach was performed measuring BRET in cells co-transfected with 1 μ g of the two cDNAs corresponding to D₂-nRLuc8 and D₂-cRLuc8 and with 1.5 μ g of the two cDNAs corresponding to σ_1 -nVenus and σ_1 -cVenus (5). As negative controls, cells transfected with the same amount of cDNA corresponding to D₂-nRLuc8, D₂-cRLuc8, σ_1 -nVenus and cVenus (1), D₂-nRLuc8, D₂-cRLuc8, σ_1 -cVenus and nVenus (2), D₂-nRLuc8, σ_1 -nVenus, σ_1 -cVenus and cRLuc8 (3), or D₂-cRLuc8, σ_1 -nVenus, σ_1 -cVenus and nRLuc8 (4) did not display any significant luminescence or positive BRET. A schematic representation of a BRET with luminescence/fluorescence complementation approach is given at the top image in which one receptor fused to the N-terminal fragment (nRLuc8) and another receptor fused to the C-terminal fragment (cRLuc8) of the RLuc8 act as BRET donor after RLuc8 reconstitution by a close receptor-receptor interaction and one receptor fused to an YFP Venus N-terminal fragment (nVenus) and another receptor fused to the YFP Venus C-terminal fragment (cVenus), act as BRET acceptor after YFP Venus reconstitution by a close receptor-receptor interaction. BRET or SRET data are expressed as means \pm S.D. of five to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET or SRET acceptor.

doi:10.1371/journal.pone.0061245.g002

31 \pm 6) but not with the antagonist PD144418 (1 μ M; BRET_{max}: 48 \pm 3 mBU; BRET₅₀: 20 \pm 5) also showed a decrease in the BRET saturation curves. Interestingly, the σ_1 antagonist PD144418 is able to revert the effect induced by cocaine (BRET_{max}: 52 \pm 9 mBU; BRET₅₀: 31 \pm 7 in the presence of cocaine and PD144418) (Fig. 3a). To know if structural changes in σ_1 - σ_1 receptor

homomers or in D₂-D₂ receptor homomers can account for the ligand-induced effect on σ_1 -D₂ receptor heteromers, we performed BRET experiments first in cells expressing σ_1 -RLuc and σ_1 -YFP receptors as indicated in Fig. 2a. Cells were treated for 10 min with 100 nM of the agonist PRE084 or 1 μ M of the antagonist PD144418 or for 30 min with 30 μ M of cocaine alone

or with 1 μM PD144418. As shown in Fig. 3b, no significant changes in BRET_{max} or BRET₅₀ were observed. Then, changes in the BRET saturation curve obtained in cells expressing a constant amount of D₂-RLuc receptors and increasing amounts of D₂-YFP receptors (BRET_{max}: 44 \pm 3 mBU; BRET₅₀: 12 \pm 4) were analyzed. The BRET saturation curve changed in cells treated for 10 min with 100 nM of PRE084 (BRET_{max}: 27 \pm 5 mBU; BRET₅₀: 11 \pm 4) or 30 min with 30 μM of cocaine (BRET_{max}: 29 \pm 2 mBU; BRET₅₀: 19 \pm 5) but not in cells treated for 10 min with 1 μM of PD144418 (BRET_{max}: 44 \pm 3 mBU; BRET₅₀: 9 \pm 3). Again the antagonist, PD144418, was able to revert the effect induced by cocaine (BRET_{max}: 43 \pm 2 mBU; BRET₅₀: 16 \pm 3 in cells pre-treated with PD144418 and cocaine) (Fig. 3c). These data suggest structural changes in the complex brought about by binding of either the σ_1 agonist PRE084 or cocaine. To test whether the effect of PRE084 or cocaine on D₂-D₂ heteromers are due to the presence of σ_1 receptors, assays were performed in cells whose σ_1 receptor expression was knocked-down using an RNAi approach (Fig. 3d). When we transfected a specific small interfering RNA (siRNA), a robust silencing of σ_1 receptor expression was obtained (Fig. S2). The treatment with the specific siRNA completely abolished the effect of cocaine or PRE084 on the BRET saturation curve. The treatment with PD144418 or PD144418 and cocaine had no effect on these knocked-down cells (Fig. 3d). These results suggest that ligand binding to σ_1 receptors induces strong changes in the structure of the D₂-D₂ receptor homomers in the σ_1 -D₂ receptor heteromers.

Cocaine Binding to σ_1 Receptors Modulates the D₂ Receptor Signaling in Transfected Cells

The cocaine-induced modifications of the quaternary structure of D₂ receptor homodimers in the σ_1 -D₂ receptor heteromer described above suggest that cocaine can modulate the functionality of D₂ receptors. To study how cocaine affects D₂ receptor-mediated signaling, Chinese hamster ovary (CHO) cells were used as they provided a lower baseline of signaling for which to detect downstream changes and have been shown to constitutively express σ_1 receptors but not DAT [16]. The effect of cocaine on D₂ receptor agonist-induced, G protein-mediated signaling was measured using a label free assay that measures changes in cell impedance in response to stimulation. In CHO cells stably expressing D₂ receptors, increasing cocaine concentrations (10 nM to 100 μM) did not give any G protein-mediated signaling, neither G_{1/0}, G_S or G_q (Fig. 4a) as compared to known control receptors (Fig. S3). The signaling obtained upon D₂ receptor activation with the agonist quinpirole (0.1 nM to 1 μM) showed a G_i profile (increases in impedance) that was completely blocked when cells were treated with the G_i specific pertussis toxin (PTx) (Fig. 4b). We observed a small but significant decrease in the G_i activation induced by quinpirole when cells were pre-treated for 1 h with 30 μM cocaine (Fig. 4c). These results indicate that cocaine by itself is not able to induce a G protein-mediated signaling but can partially inhibit the ability of D₂ receptors to signal through G_i. A downstream consequence of G_i mediated signaling is the ability to decrease cAMP signaling. In addition to the label free experiments above we determined the levels of cAMP in CHO cells stably expressing D₂ receptors using forskolin and then measured whether cocaine was able to decrease the forskolin-induced cAMP formation. We found cocaine alone could not decrease the levels of cAMP after treatment with forskolin compared to the D₂ agonist quinpirole (Fig. 4d). However, cocaine significantly dampened the quinpirole-induced decreases of forskolin-mediated increases in cAMP levels (Fig. 4d). This effect was blocked when cells were transfected with siRNA against the σ_1 receptor (Fig. 4d),

demonstrating that cocaine's ability to counteract the action of quinpirole was mediated by σ_1 receptors. Similar results were obtained when instead of cocaine the σ_1 receptor agonist PRE084 was used (Fig. S4) reinforcing the concept that σ_1 receptor ligands induce a significant decrease in the ability of D₂ receptors to signal through G_i.

Apart from G protein-mediated signaling, many GPCRs are able to signal in a G protein-independent way [33–37]. ERK 1/2 phosphorylation is one of the MAPK pathways that has been described to be activated in a G protein-independent and arrestin-dependent mechanism [36]. Several reports have highlighted the importance of ERK 1/2 activation in D₂ receptors containing neurons for the effects of cocaine [38–41]. We sought to understand how cocaine might influence σ_1 -D₂ receptor heteromer-mediated ERK 1/2 signaling. Varying concentrations of cocaine and varying the time of treatment did not lead to any significant change in ERK 1/2 phosphorylation in response to cocaine in cells not expressing D₂ receptors (Fig. S5). Importantly, cocaine *per se* dose-dependently (Fig. S6a) and time-dependently (Fig. S6b) activated ERK 1/2 phosphorylation in cells expressing D₂ receptors. This effect was mediated by σ_1 receptors since it was strongly diminished in cells transfected with the σ_1 receptors siRNA (Figs. S6a and S6b). The D₂ receptor agonist quinpirole was also dose-dependently (Fig. S6c) and time-dependently (Fig. S6d) able to activate ERK 1/2 phosphorylation but, as expected, this effect was not mediated by σ_1 receptors since it was not diminished in cells transfected with the σ_1 receptors siRNA (Figs. S6c and S6d). These results point out that σ_1 or D₂ receptor activation in the σ_1 -D₂ receptor heteromer induces ERK 1/2 phosphorylation. Thus, cocaine, like quinpirole, can act as an agonist at the MAPK activation level for the heteromer.

A property of some receptor heteromers is the ability of the antagonist of one receptor to block the function of the agonist of the partner receptor, a property defined as cross-antagonism [22,42]. In cells expressing D₂ receptors we looked for cross-antagonism among σ_1 -D₂ receptor heteromers. Indeed we found the cocaine-induced ERK 1/2 phosphorylation was counteracted not only by the σ_1 receptor antagonist PD144418 (1 μM) but also by the D₂ receptor antagonist raclopride (10 μM) (Fig. 5a). Analogously, the D₂ receptor agonist quinpirole-induced ERK 1/2 phosphorylation was blocked by raclopride but also by PD144418 (Fig. 5b). These data suggest that antagonist binding leads to structural changes within the receptor heteromer that block signaling through the partner receptor. By definition an antagonist cannot signal on its own, therefore this cross-antagonism can only derive from the direct protein-protein interactions established between the receptors in the σ_1 -D₂ receptor heteromer. This hypothesis is further supported by the fact that silencing cells of the σ_1 receptor led to a complete loss in this cross-antagonism. That is, the effect of PD144418 on quinpirole-induced ERK1/2 phosphorylation was not observed when cells were transfected with the siRNA for σ_1 receptors (Fig. 5b).

As mentioned above cocaine can inhibit DAT and increase the dopamine concentration in the striatum; so, in the presence of cocaine both receptors in the σ_1 -D₂ receptor heteromer could be activated. Therefore we asked, what happens to ERK 1/2 phosphorylation after co-activation of both receptors? Surprisingly, a negative cross-talk was detected. When cells expressing D₂ receptors were treated with both 1 μM quinpirole and 30 μM cocaine there was a decrease in ERK 1/2 phosphorylation compared to quinpirole alone (Fig. 5c). This difference was not seen if the cells were depleted of σ_1 receptors via siRNA (Fig. 5c).

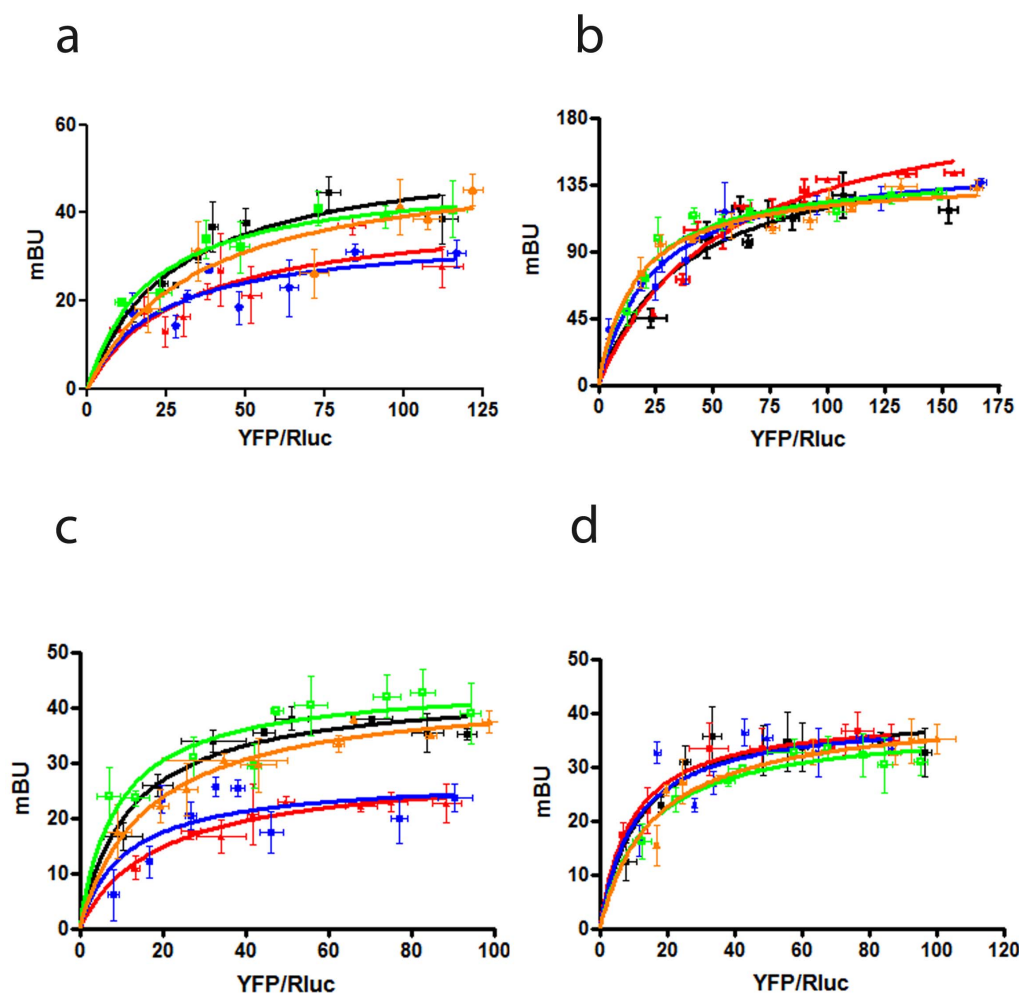


Figure 3. Effect of σ_1 receptor ligands on σ_1 -D₂ receptor heteromer. BRET was measured in HEK-293T cells cotransfected with: (a) D₂-Rluc cDNA (0.4 μ g) and increasing amounts of σ_1 -YFP receptor cDNA (0.1 to 1 μ g), (b) σ_1 -Rluc cDNA (0.2 μ g) and increasing amounts of σ_1 -YFP receptor cDNA (0.1 to 1 μ g), (c) D₂-Rluc cDNA (0.4 μ g) and increasing amounts of D₂-YFP receptor cDNA (0.2 to 2 μ g), not treated (black), treated for 30 min with 30 μ M cocaine (red), treated for 10 min with 100 nM PRE084 (blue) or 1 μ M PD144418 (green) or treated for 30 min with 30 μ M cocaine and 1 μ M PD144418 (orange). The relative amount of BRET acceptor is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor minus the fluorescence detected in cells only expressing the donor, and the luciferase activity of the donor (YFP/Rluc). BRET data are expressed as means \pm SD of four to six different experiments grouped as a function of the amount of BRET acceptor.
doi:10.1371/journal.pone.0061245.g003

σ_1 -D₂ Receptor Heteromers are Found in the Brain Striatum

The BRET experiments and the signaling experiments are all suggestive of functional complexes that can lead to changes in D₂ receptor function. However, all of these experiments were performed in transfected cells. To establish whether these complexes and their functional implications can be seen in tissue we obtained striatum from wild type (WT) and σ_1 knockout (KO) mice. The striatum express D₂ receptor containing neurons of the indirect motor pathway and is one of the key areas of the brain where cocaine imposes its effects. First we examined whether σ_1 -D₂ receptor heteromers could be detected in native tissue. We performed Western blot experiments and found the expression of both receptors in the striatum of WT mice and the expression of D₂ receptors but not σ_1 receptors in the striatum of KO mice (Fig. 6a). Next we performed co-immunoprecipitation experiments and found the antibody against D₂ receptor could indeed co-precipitate D₂ receptors and σ_1 receptor (Fig. 6a) in WT mice

striatum treated or not with 150 μ M cocaine. This co-precipitation was not observed when tissue from σ_1 receptor KO animals was used (Fig. 6a). Although supportive of the BRET experiments above and highly suggestive of heteromers in striatum, we wanted to ensure that these complexes were not an artifact of the detergent solubilization. To test this we used the recently developed proximity ligation assay on slices of striatum from both WT and σ_1 KO mice [42]. Using immunohistochemistry, we first checked the expression of σ_1 receptors in WT animals but not in KO animals (Fig. S7) and the expression of D₂ receptors in both WT and KO animals (Fig. S8). Next we performed the proximity ligation assay on striatal slices from WT animals. The slices were treated or not with 150 μ M cocaine and as shown in Figure 6 (b and d) a red punctate fluorescent staining was observed, indicating both receptors are indeed in a complex in mice striatum in the presence or absence of cocaine. As a negative control we repeated this with only one of the two primary antibodies, and staining was not seen (Fig. S9). As expected, the

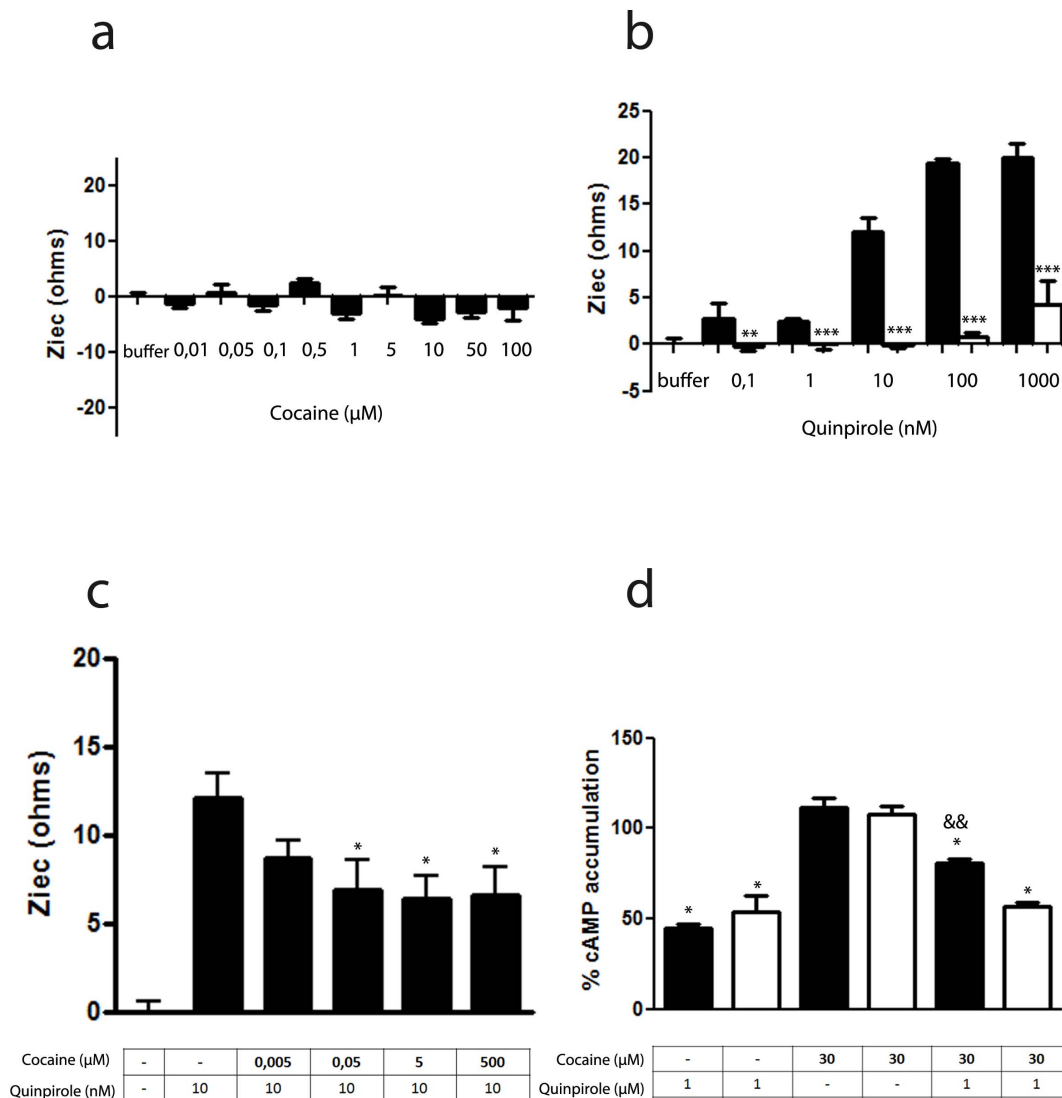


Figure 4. Cocaine binding to σ_1 receptor modulates the G_i-dependent D₂ receptor signaling in transfected cells. In (a to c) CellKey label-free assays were performed in CHO cells stable expressing D₂ receptors. In (a) cells were stimulated with buffer (B) or with increasing concentrations of cocaine. In (b) cells were preincubated (black columns) or not (white columns) with PTx (10 ng/ml) overnight and stimulated with buffer (B) or increasing concentrations of quinpirole. In (c) cells were stimulated with increasing concentrations of cocaine in the presence of 10 nM of quinpirole. In (d) cAMP production was determined in CHO cells stable expressing D₂ receptors not transfected (black columns) or transfected (white columns) with siRNA corresponding to σ_1 receptor (6.25 μg of oligonucleotides) and stimulated with 5 μM forskolin in absence (100%) or presence of 1 μM quinpirole, 30 μM cocaine alone or in combination. Percent of cAMP produced respect to 5 μM forskolin treatment was represented. Results are as mean \pm S.E.M from 4–8 independent experiments. Statistical significance was calculated by one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test; in b ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$ compared with cells not transfected with siRNA, in c * $p < 0.05$ compared with cells only treated with quinpirole, in d && $p < 0.01$ compared to the corresponding quinpirole-treated cells and * $p < 0.05$ and *** $p < 0.005$ compared with forskolin-treated cells (100%).

doi:10.1371/journal.pone.0061245.g004

red punctate fluorescent staining was not observed when the experiments were performed with striatal slices from σ_1 KO mice (Fig. 6c and e). These data further support the existence of σ_1 -D₂ receptor heteromers in the striatum.

Cocaine Binding to σ_1 Receptors Modulates the D₂ Receptor Signaling in Mouse Brain Striatum

The above data provide strong evidence of σ_1 -D₂ receptor heteromers in vivo but they do not say anything about the function of these complexes. We decided to test whether the negative cross-talk seen in signaling in transfected cells could also

be found in the striatum. Striatum slices from WT and KO mice were tested for the effects of cocaine on ERK 1/2 phosphorylation. In co-transfected cells a strong and significant effect of cocaine was observed at 15 μM (see Fig. 5), a striatal level of the drug reached after pharmacologically significant doses of cocaine [43]. To allow diffusion into the tissue a ten-fold higher cocaine concentration, 150 μM , was then used to see clear effects in slices of mouse striatum. Both the D₂ receptor agonist quinpirole (1 μM) and cocaine (150 μM) induced ERK 1/2 phosphorylation in striatal slices from WT mice after 10 min activation (Fig. S10) or after 30 min activation (Fig. 7a). More interestingly, in striatal slices of WT mice, the co-activation with quinpirole and cocaine

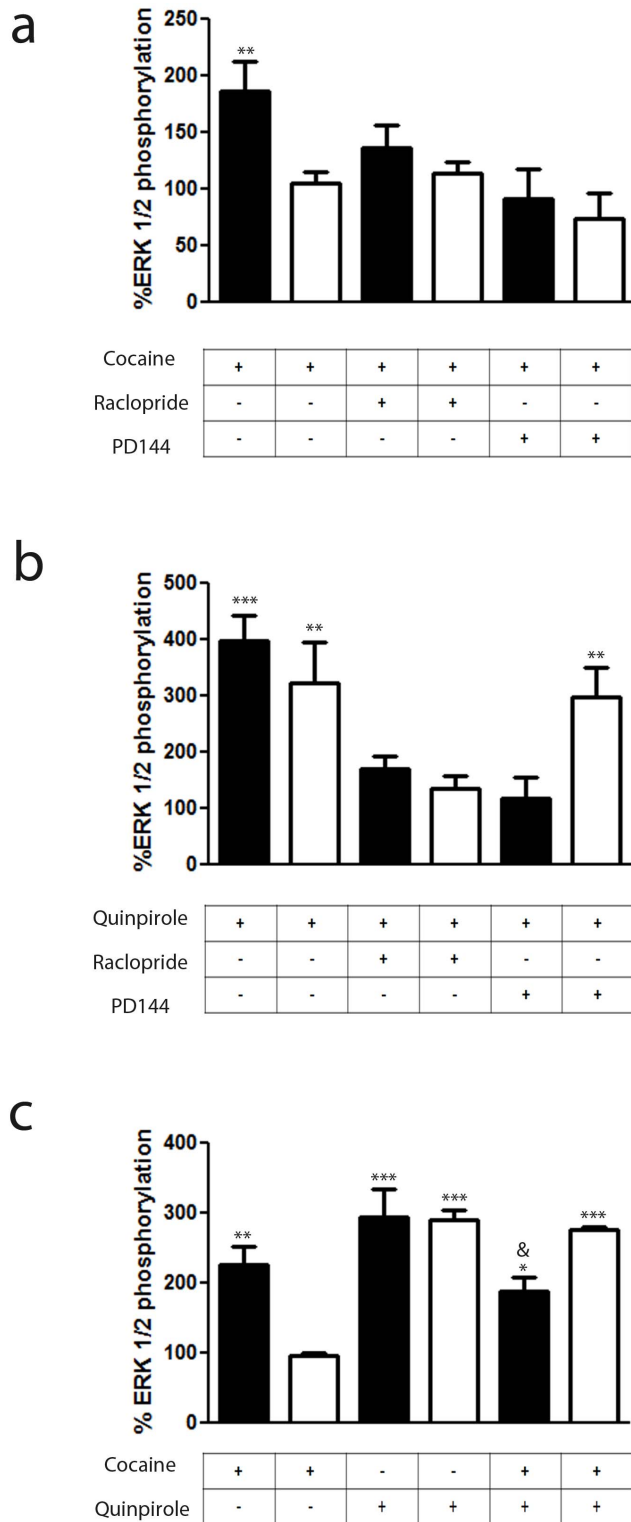


Figure 5. Cocaine binding to σ_1 receptor modulates the ERK 1/2 signaling in transfected cells. CHO cells were transfected with D₂ receptor cDNA (1 μ g, black bars) or cotransfected (white bars) with D₂ receptor cDNA and σ_1 receptor siRNA (6.25 μ g of oligonucleotides). Cells were incubated for 30 min (a) or 10 min (b) with medium (basal) or with 30 μ M cocaine (a) or 1 μ M quinpirole (b) in the absence or in the presence of 10 μ M raclopride or 100 nM PD144418. In (c) cells were treated with medium (basal), 30 μ M cocaine for 30 min, 1 μ M quinpirole for 10 min or 30 μ M cocaine for 30 min and, during the

last 10 min, with 1 μ M quinpirole. In all cases, ERK 1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are mean \pm SEM of six to eight independent experiments performed in duplicate. Bifactorial ANOVA showed a significant (** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$) effect over basal.

doi:10.1371/journal.pone.0061245.g005

blocked ERK 1/2 phosphorylation (Figs. 7a and S10). Thus, the negative cross-talk between σ_1 and D₂ receptors on MAPK signaling detected in cotransfected cells was also observed in striatal samples from WT mice, meaning that the same biochemical fingerprint seen in transfected cells was also found in WT mice. When similar experiments were performed in striatal slices from mice lacking the σ_1 receptors, cocaine was unable to induce ERK 1/2 phosphorylation (Figs. 7a and S10) and quinpirole-induced ERK 1/2 phosphorylation was not modified by cocaine (Figs. 7a and S10). These results strongly support the existence of functional σ_1 -D₂ receptor heteromers in the striatum and indicate that all detected cocaine effects are dependent on σ_1 receptors expression.

Discussion

The data presented in this paper lead to several major conclusions on the role σ_1 receptors play in modulating D₂ receptor upon cocaine exposure. First, D₂ receptors can form heteromers with σ_1 receptors, a result that is specific to D₂ receptors as the other members of the D₂-like family, D₃ and D₄ receptors, did not form heteromers. Second, these σ_1 -D₂ receptor heteromers are found in mouse striatum and are functional. Third, σ_1 -D₂ receptor heteromers consist of higher order oligomers with a minimal structure of σ_1 - σ_1 -D₂-D₂ receptor heterotetramers. Finally, cocaine, by binding to σ_1 -D₂ receptor heteromers, inhibits downstream signaling in both cultured cells and in mouse striatum.

Cocaine intake elevates dopamine levels in the striatum, particularly in its more ventral part, the nucleus accumbens, which has been shown to be a preferential anatomical substrate for reward [44,45]. Cocaine exploits the dopaminergic system to elicit part of its behavioral and cellular effects [14]. Earlier studies have suggested that the presynaptic dopamine transporter (DAT) is the primary target for cocaine effects [46–49]. However, not all cocaine effects are mediated by a dopamine increase derived by the cocaine inhibition of DAT. Indeed, cocaine interacts with many proteins, and it is now well established that cocaine interacts with σ_1 receptors at physiologically relevant concentrations [50–55]. In fact, reducing brain σ_1 receptor levels with antisense oligonucleotides attenuates the convulsive and locomotor stimulant actions of cocaine [56,57] and antagonists for σ_1 receptors have also been shown to mitigate the actions of cocaine in animal models [50,58]. σ_1 receptors are highly expressed in the brain [24,59]. Within the caudate-putamen and nucleus accumbens (the dorsal and ventral parts of the striatum, respectively), brain regions that mediate the long-term effects of cocaine, it was demonstrated that repeated cocaine administration induces up-regulation of σ_1 receptors, a process mediated by dopamine D₁ receptors [60]. Indeed, we have demonstrated earlier the importance of the σ_1 and D₁ receptor interaction on the initial events upon cocaine exposure [16]. In addition, others have shown σ_1 can modulate signaling of a different GPCR family [61]. Through σ_1 -D₁ receptor heteromers, cocaine robustly potentiated D₁ receptor-mediated adenylyl cyclase activation, providing a mechanism for D₁ receptor-mediated effects of cocaine [16]. In addition to DAT and D₁ receptors, our work here highlights the importance of σ_1 receptors. Our data suggest that it is σ_1 receptors that are able to

a

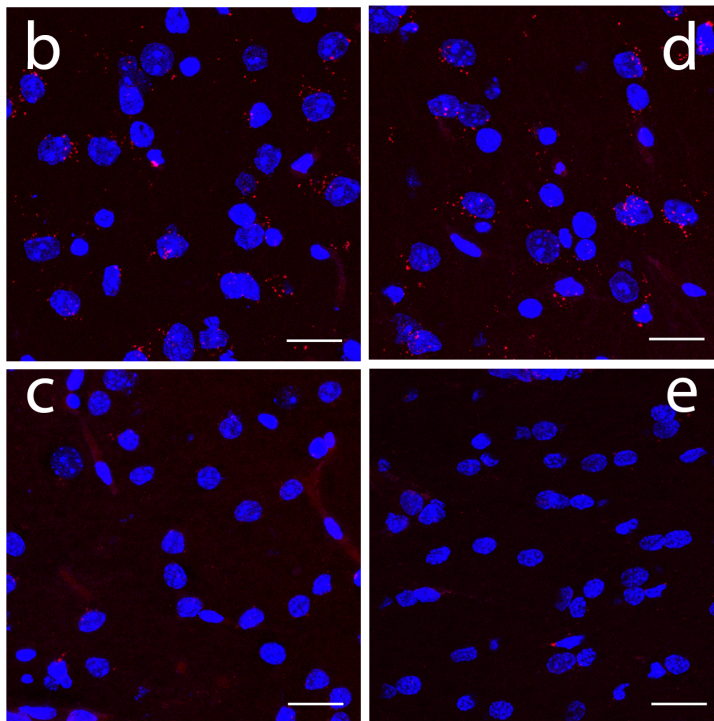
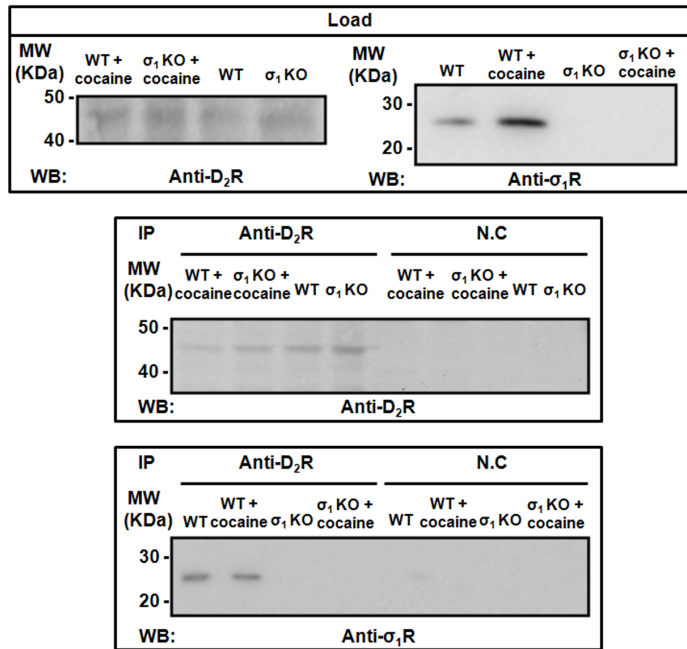
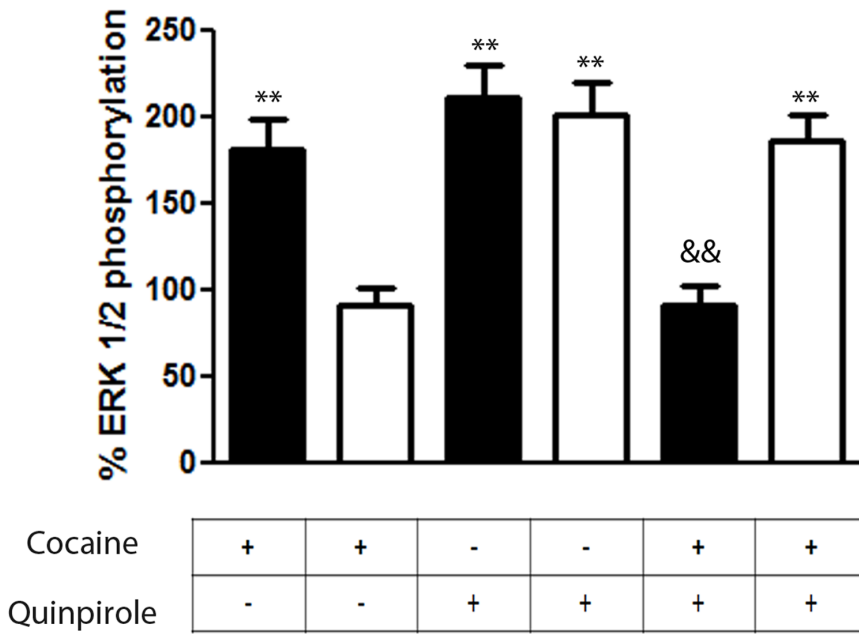


Figure 6. Expression of σ_1 -D₂ receptor heteromers in the striatum. In (a) co-immunoprecipitation experiments are shown. Striatal slices from WT and KO mice were untreated or treated with 150 μ M cocaine for 30 min. From slices solubilized striatal membranes (top panel) and immunoprecipitates with anti-D₂ receptor antibody or anti-FLAG antibody as negative control (NC) (middle and bottom panels) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using mouse anti-D₂ receptor antibody or mouse anti- σ_1 receptor antibody. IP: immunoprecipitation; WB: western blotting; MW, molecular mass. In (b to e) Proximity Ligation Assay (PLA) was performed as indicated in Materials and Methods, using WT (b and d) or KO (c and e) mouse striatal slices not treated (b and c) or treated (d and e) with 150 μ M cocaine for 30 min. σ_1 -D₂ receptor heteromers were visualized as red spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0061245.g006

a



b

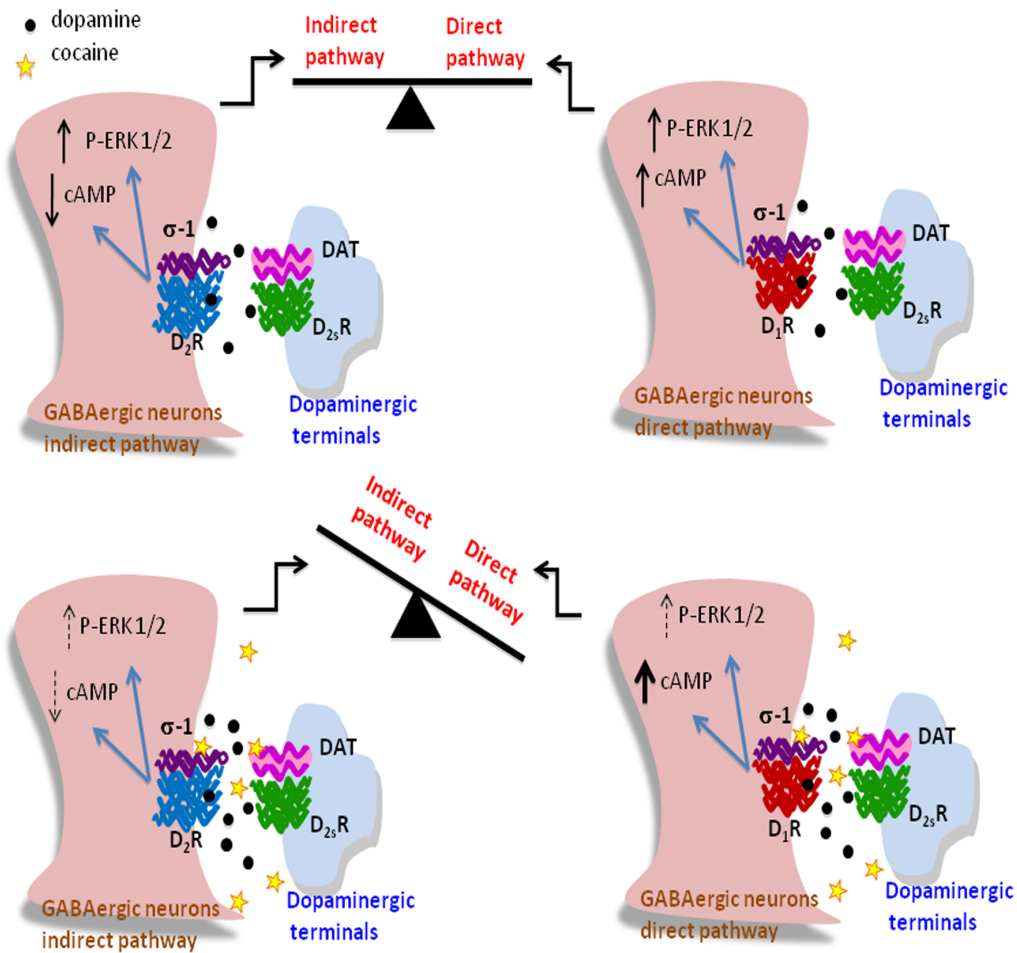


Figure 7. Negative cross-talk between cocaine and the D₂ receptor agonist quinpirole on ERK 1/2 phosphorylation in mice striatum. In (a) WT (black bars) and σ_1 receptor KO (white bars) mouse striatal slices were treated with 1 μ M quinpirole for 10 min, with 150 μ M cocaine for 30 min or with cocaine for 30 min and, during the last 10 min, with quinpirole. Immunoreactive bands from six slices obtained from five WT or five KO animals were quantified for each condition. Values represent mean \pm SEM of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. No significant differences were obtained between the basal levels of the WT and the σ_1 receptor KO mice. Bifactorial ANOVA showed a significant (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005) effect over basal. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant cocaine-mediated counteraction of quinpirole (* p <0.05, & p <0.01). In (b) a representative scheme summarizing the overall results is shown. Top images represent D₂ and D₁ receptors signaling in the indirect and direct striatal pathway neurons after dopamine binding. Bottom images represent the effect of cocaine increasing the dopamine by inhibiting dopamine transporters (DAT) and interacting with σ_1 receptors within σ_1 -D₂ and σ_1 -D₁ receptor heteromers, changing the dopamine receptor signaling.
doi:10.1371/journal.pone.0061245.g007

directly modulate the normally balanced D₁ and D₂ pathways via receptor-receptor interactions.

The cocaine effect on σ_1 -D₂ receptor heteromer signaling is in contrast with the cocaine effect on σ_1 -D₁ receptor heteromer signaling described by Navarro et al [16]. In the last case, the D₁ receptor-mediated activation of cAMP production was significantly increased by cocaine binding to a σ_1 protomer in the σ_1 -D₁ receptor heteromers, resulting in a cocaine-induced increase in cAMP production. The results here described and those described by Navarro et al [16], point to the scenario that is shown in Figure 7b, where cocaine selectively leads to increased dopamine-induced signaling through the cAMP pathway in D₁ receptor-containing neurons and to depressed dopamine-induced inhibition of cAMP formation in D₂ receptor-containing neurons. Simultaneously, cocaine alters the levels of the initial ERK 1/2 phosphorylation signaling induced by dopamine in both D₁ receptor and D₂ receptor-containing neurons. These findings suggest that cocaine exposure leads to a deregulation of a normally balanced D₁/D₂ dopamine receptor signaling (Fig. 7b). The balance of D₁ and D₂ inputs is designed to avoid addictive behavior, thus its disruption would have long term consequences. The data presented here support a key role of σ_1 receptors in destabilizing this balance by increasing the D₁ receptor-mediated cAMP production and dampening the D₂ receptor signaling in σ_1 -D₂ receptor heteromers, pushing the balance of inputs towards the D₁ containing, pro-reward and motivating pathway. Our data is supported by the results described by Durieux and colleagues where they found that striatal D₂R neurons can limit both locomotion and drug reinforcement and are organized in specific cell types [6,8]. Luo et al [9], have found in vivo evidence for the existence of D₁ and D₂ receptor-mediated cellular effects of cocaine (D₁ receptor-mediated increase in Ca²⁺ influx and D₂ receptor-mediated decrease in Ca²⁺ influx, using in vivo optical microprobe Ca²⁺ influx imaging), with significantly slower dynamics of the effect mediated by D₂ receptors. Taking into account our findings, the observations of Luo et al could in fact be linked with the signaling brake imposed by cocaine on the σ_1 -D₂ receptor heteromer. Further, Ferraro et al. have found cocaine alone had no effect on striatal glutamate levels but when injected with a D₂ ligand there were significant changes [62]. Xu et al have shown that a σ_1 receptor ligand can reverse the effects of cocaine in rats strongly suggesting that blocking cocaine's actions via σ_1 receptor in σ_1 -D₂ complexes could serve as an effective strategy to blunt the cellular signaling effects of cocaine [63]. Finally, Hiranita et al have shown that a combined strategy of blocking DAT and σ_1 is effective at reducing cocaine self-administration. However, in a follow up study this same group shows that after cocaine self-administration σ_1 receptor effects seem to be independent of dopamine pathways [54]. These are in line with our observations that the initial effects of cocaine disrupt the D₁/D₂ pathways. In summary, the results described here along with the highlighted previous studies support a model where the initial exposure to cocaine affects differently the direct (D₁ containing) and indirect

(D₂ containing) pathways via σ_1 receptor heteromers which may significantly influence dopaminergic neurotransmission.

Supporting Information

Figure S1 Chemical structure of compounds used. a) cocaine, b) σ_1 receptor agonist PRE084, c) σ_1 receptor antagonist PD144418, d) D₂ receptor agonist quinpirole, e) D₂ receptor antagonist raclopride.
(TIF)

Figure S2 Effect of σ_1 receptor siRNA transfection on σ_1 receptor expression. Membranes from non-transfected HEK-293T cells (wt) or cells transfected with σ_1 receptor siRNA (6.25 μ g of oligonucleotides) or irrelevant oligonucleotides (oligo, 6.25 μ g of oligonucleotides) were analyzed by SDS/PAGE and immunoblotted with the anti- σ_1 receptor antibody. Values are mean \pm SEM of three experiments. *** P <0.001 compared with non-transfected cells (one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests).
(TIF)

Figure S3 Control CellKey label-free assays. HEK-293T cells were stably transfected with the G_s protein-coupled adenosine A_{2A} receptor (a), the G_i protein-coupled adenosine A₁ receptor (b) or untransfected (c) in 96 well Cell-Key plates. Impedance changes were measured upon addition of 10 nM CGS 21680 (A_{2A} receptor agonist) in (a), 10 nM CPA (A₁ receptor agonist) in (b) or 50 nM thrombin (the agonist for the endogenous G_q protein-couples thrombin receptors) in (c). Plot shapes are consistent with the expected results for the respective G-proteins.
(TIF)

Figure S4 σ_1 receptor agonist modulates the D₂ receptor-mediated cAMP decreases. cAMP production was determined in CHO cells stable expressing D₂ receptors not transfected (black columns) or transfected (white columns) with siRNA corresponding to σ_1 receptor (6.25 μ g of oligonucleotides). Cells were stimulated with 5 μ M forskolin in absence (100%) or presence of 1 μ M quinpirole, 100 nM PRE084 alone or in combination. Percent of cAMP produced respect to forskolin treatment was represented. Results are as mean \pm S.E.M from five independent experiments. Statistical significance was calculated by one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test; *** p <0.005 compared with forskolin-treated cells (100%) and && p <0.01 compared with the corresponding only quinpirole-treated cells.
(TIF)

Figure S5 Cocaine effect on ERK 1/2 phosphorylation in cells not expressing D₂ receptors. CHO cells were incubated with increasing cocaine concentrations for 30 min (a) or with 30 μ M cocaine for increasing time periods (b). ERK1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%, non-treated cells). Results are mean \pm SEM of three to four independent experiments performed in duplicate.

(TIF)

Figure S6 Cocaine-induced σ_1 -D₂ receptor heteromer-mediated ERK 1/2 phosphorylation in transfected cells.

CHO cells transfected with D₂ receptor cDNA (1 μ g, black bars) or cotransfected (white bars) with D₂ receptor cDNA and σ_1 receptor siRNA (6.25 μ g of oligonucleotides) were incubated with increasing cocaine concentrations for 30 min (a), with 30 μ M cocaine for increasing time periods (b), with increasing quinpirole concentrations for 10 min (c) or with 1 μ M quinpirole for increasing time periods (d). ERK1/2 phosphorylation is represented as percentage over basal levels (100%). Results are mean \pm SEM of four to six independent experiments performed in duplicate. In all samples in (c) and (d) and samples without siRNA transfection in (a) and (b), Bifactorial ANOVA showed a significant ($p < 0.01$) effect of cocaine or quinpirole over basal, and Bonferroni post hoc tests showed a significant counteraction of cocaine effect by siRNA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$ compared with sample with the same treatment and with siRNA transfection). (TIF)

Figure S7 Expression of σ_1 receptor in the striatum. WT (a) or σ_1 receptor KO (b) mouse striatal slices were processed for immunohistochemistry as indicated in Materials and Methods using an anti- σ_1 antibody. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m. (TIF)

Figure S8 Expression of D₂ receptor in the striatum. WT (a) or σ_1 receptor KO (b) mouse striatal slices were processed for immunohistochemistry as indicated in Materials and Methods using an anti-D₂ antibody (green). Scale bar: 20 μ m. (TIF)

Figure S9 Negative controls for in situ proximity ligation assays. Negative controls for in situ proximity ligation

assays (see Materials and Methods) were performed in WT mouse striatal slices incubated with only anti- σ_1 (a) or anti-D₂ (b) antibody as primary antibodies. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m. (TIF)

Figure S10 Negative cross-talk between cocaine and the D₂ receptor agonist quinpirole on ERK 1/2 phosphorylation in mouse striatum. WT (black bars) and σ_1 receptor KO (white bars) mouse striatal slices were treated for 10 min with 1 μ M quinpirole, with 150 μ M cocaine or with both. Immunoreactive bands from six slices obtained from five WT or five KO animals were quantified for each condition. Values represent mean \pm SEM of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. No significant differences were obtained between the basal levels of the wild-type and the KO mice. Bifactorial ANOVA showed a significant (** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$) effect over basal. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant cocaine-mediated counteraction of quinpirole (&&& $p < 0.005$). (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Jasmina Jiménez for technical help (University of Barcelona). We thank Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain) for providing σ_1 receptor KO and WT mice brains.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GN VC SF EC CL PJM. Performed the experiments: GN EM JB MB DF JM AC VC DA. Analyzed the data: GN EM VC SF EC CL PJM. Contributed reagents/materials/analysis tools: RF EC. Wrote the paper: EC SF CL PJM.

References

- Kreitzer AC, Malenka RC (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60: 543–554. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.005.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, et al. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429–1432.
- Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ (1993) Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. *J Neurosci* 13: 1080–1087.
- Kalivas PW, Volkow ND (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162: 1403–1413. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1403.
- Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology* 7: 69–76. doi:10.1016/j.coph.2006.11.003.
- Durieux PF, Schiffmann SN, De Kerchove d'Exaerde A (2012) Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions. *EMBO J* 31: 640–653. doi:10.1038/emboj.2011.400.
- Xu M, Hu X-T, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, et al. (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79: 945–955. doi:10.1016/0092-8674(94)90026-4.
- Durieux PF, Bearzatto B, Guiducci S, Buch T, Waisman A, et al. (2009) D2R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nat Neurosci* 12: 393–395. doi:10.1038/nn.2286.
- Luo Z, Volkow ND, Heintz N, Pan Y, Du C (2011) Acute Cocaine Induces Fast Activation of D1 Receptor and Progressive Deactivation of D2 Receptor Striatal Neurons: In Vivo Optical Microprobe [Ca²⁺]_i Imaging. *The Journal of Neuroscience* 31: 13180–13190. doi:10.1523/JNEUROSCI.2369-11.2011.
- Welter M, Vallone D, Samad TA, Meziane H, Usiello A, et al. (2007) Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6840–6845.
- Rougé-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Vincenzo Piazza P, et al. (2002) Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: Crucial control by D2 receptors. *Journal of Neuroscience* 22: 3293–3301.
- Krawczyk M, Sharma R, Mason X, DeBacker J, Jones AA, et al. (2011) A Switch in the Neuromodulatory Effects of Dopamine in the Oval Bed Nucleus of the Stria Terminalis Associated with Cocaine Self-Administration in Rats. *The Journal of Neuroscience* 31: 8928–8935. doi:10.1523/JNEUROSCI.0377-11.2011.
- Thompson D, Martini L, Whistler JL (2010) Altered ratio of D1 and D2 dopamine receptors in mouse striatum is associated with behavioral sensitization to cocaine. *PLoS ONE* 5: e11038. doi:10.1371/journal.pone.0011038.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009) Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9: 53–58. doi:10.1016/j.coph.2008.12.002.
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, et al. (2008) The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* 11: 780–789. doi:10.1038/nn.2146.
- Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, et al. (2010) Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 18676–18681. doi:10.1073/pnas.1008911107.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, De Benedetti P, et al. (2003) Adenosine A2A-Dopamine D2 Receptor-Receptor Heteromerization. *Journal of Biological Chemistry* 278: 46741–46749. doi:10.1074/jbc.M306451200.
- González S, Moreno-Delgado D, Moreno E, Pérez-Capote K, Franco R, et al. (2012) Circadian-Related Heteromerization of Adrenergic and Dopamine D4 Receptors Modulates Melatonin Synthesis and Release in the Pineal Gland. *PLoS Biol* 10: e1001347. doi:10.1371/journal.pbio.1001347.
- Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casadó V, et al. (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 5: 727–733. doi:10.1038/nmeth.1229.
- Langa F, Codony X, Tovar V, Lavado A, Giménez E, et al. (2003) Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. *European Journal of Neuroscience* 18: 2188–2196. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02950.x.
- Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M, Navarro G, Casadó V, et al. (2011) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem* 286: 5846–5854. doi:10.1074/jbc.M110.161489.

22. Moreno E, Vaz SH, Cai N-S, Ferrada C, Quiroz C, et al. (2011) Dopamine-Galanin Receptor Heteromers Modulate Cholinergic Neurotransmission in the Rat Ventral Hippocampus. *J Neurosci* 31: 7412–7423. doi:10.1523/JNEUROSCI.0191-11.2011.
23. Schroder R, Schmidt J, Blattermann S, Peters L, Janssen N, et al. (2011) Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protocols* 6: 1748–1760. doi:10.1038/nprot.2011.386.
24. Hayashi T, Su T (2005) The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol* 3: 267–280.
25. Kourrich S, Su T-P, Fujimoto M, Bonci A (2012) The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci* 35: 762–771. doi:10.1016/j.tins.2012.09.007.
26. Ng GYK, O'Dowd BF, Lee SP, Chung HT, Brann MR, et al. (1996) Dopamine D2 Receptor Dimers and Receptor-Blocking Peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227: 200–204. doi:10.1006/bbrc.1996.1489.
27. Lee SP, O'Dowd BF, Ng GYK, Varghese G, Akil H, et al. (2000) Inhibition of Cell Surface Expression by Mutant Receptors Demonstrates that D2 Dopamine Receptors Exist as Oligomers in the Cell. *Molecular Pharmacology* 58: 120–128.
28. Armstrong D, Strange PG (2001) Dopamine D2 Receptor Dimer Formation. *Journal of Biological Chemistry* 276: 22621–22629. doi:10.1074/jbc.M006936200.
29. Guo W, Shi L, Javitch JA (2003) The Fourth Transmembrane Segment Forms the Interface of the Dopamine D2 Receptor Homodimer. *Journal of Biological Chemistry* 278: 4385–4388. doi:10.1074/jbc.C200679200.
30. Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, et al. (2008) Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J* 27: 2293–2304. doi:10.1038/emboj.2008.153.
31. Sharkey J, Glen KA, Wolfe S, Kuhar MJ (1988) Cocaine binding at [sigma] receptors. *European Journal of Pharmacology* 149: 171–174. doi:10.1016/0959-8890(88)90058-1.
32. Maurice T, Su T-P (2009) The pharmacology of sigma-1 receptors. *Pharmacol Ther* 124: 195–206. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.07.001.
33. Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, et al. (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* 283: 655–661.
34. Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375: 503–515. doi:10.1042/BJ20031076.
35. Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, et al. (2005) An Akt/[beta]-Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell* 122: 261–273. doi:10.1016/j.cell.2005.05.012.
36. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, et al. (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* 281: 1261–1273.
37. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007) β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu Rev Physiol* 69: 483–510. doi:10.1146/annurev-physiol.69.022405.154749.
38. Valjent E, Corvol J-C, Pages C, Besson M-J, Maldonado R, et al. (2000) Involvement of the Extracellular Signal-Regulated Kinase Cascade for Cocaine-Rewarding Properties. *J Neurosci* 20: 8701–8709.
39. Lu L, Koya E, Zhai H, Hope B, Shaham Y (2006) Role of ERK in cocaine addiction. *Trends in Neurosciences* 29: 695–703. doi:10.1016/j.tins.2006.10.005.
40. Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, et al. (2010) Cell Type-Specific Loss of BDNF Signaling Mimics Optogenetic Control of Cocaine Reward. *Science* 330: 385–390. doi:10.1126/science.1188472.
41. Hoffmann HM, Nadal R, Vignes M, Ortiz J (2012) Chronic cocaine self-administration modulates ERK1/2 and CREB responses to dopamine receptor agonists in striatal slices. *Addict Biol* 17: 565–575. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00353.x.
42. Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, et al. (2012) Cannabinoid Receptors CB1 and CB2 Form Functional Heteromers in Brain. *J Biol Chem* 287: 20851–20865. doi:10.1074/jbc.M111.335273.
43. Pettit HO, Pan HT, Parsons LH, Justice JB Jr (1990) Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. *J Neurochem* 55: 798–804.
44. Koob GF (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101 Suppl 1: 23–30. doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01586.x.
45. Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 7: 69–76. doi:10.1016/j.coph.2006.11.003.
46. Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237: 1219–1223.
47. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606–612. doi:10.1038/379606a0.
48. Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou F-M, et al. (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9333–9338. doi:10.1073/pnas.0600905103.
49. Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Nacher A, Merino V, et al. (2009) A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 207: 281–289. doi:10.1007/s00213-009-1653-x.
50. Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ (2003) Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* 469: 1–12.
51. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E (2008) Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol* 6: 344–366. doi:10.2174/157015908787386113.
52. Kourrich S, Hayashi T, Chuang J-Y, Tsai S-Y, Su T-P, et al. (2013) Dynamic Interaction between Sigma-1 Receptor and Kv1.2 Shapes Neuronal and Behavioral Responses to Cocaine. *Cell* 152: 236–247. doi:10.1016/j.cell.2012.12.004.
53. Hiranita T, Soto PL, Tanda G, Katz JL (2010) Reinforcing Effects of σ -Receptor Agonists in Rats Trained to Self-Administer Cocaine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 332: 515–524. doi:10.1124/jpet.109.159236.
54. Hiranita T, Mereu M, Soto PL, Tanda G, Katz JL (2013) Self-administration of cocaine induces dopamine-independent self-administration of sigma agonists. *Neuropsychopharmacology* 38: 605–615. doi:10.1038/npp.2012.224.
55. Katz JL, Su T-P, Hiranita T, Hayashi T, Tanda G, et al. (2011) A Role for Sigma Receptors in Stimulant Self-Administration and Addiction. *Pharmaceuticals (Basel)* 4: 880–914. doi:10.3390/ph4060880.
56. Matsumoto RR, McCracken KA, Friedman MJ, Pouw B, De Costa BR, et al. (2001) Conformationally restricted analogs of BD1008 and an antisense oligodeoxynucleotide targeting sigma1 receptors produce anti-cocaine effects in mice. *Eur J Pharmacol* 419: 163–174.
57. Matsumoto RR, McCracken KA, Pouw B, Zhang Y, Bowen WD (2002) Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* 42: 1043–1055.
58. Hiranita T, Soto PL, Kohut SJ, Kopajtic T, Cao J, et al. (2011) Decreases in cocaine self-administration with dual inhibition of the dopamine transporter and σ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 339: 662–677. doi:10.1124/jpet.111.185025.
59. Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, et al. (2000) Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97: 155–170.
60. Zhang D, Zhang L, Tang Y, Zhang Q, Lou D, et al. (2005) Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. *Neuropsychopharmacology* 30: 1443–1454. doi:10.1038/sj.npp.1300680.
61. Kim FJ, Kovalyshyn I, Burgman M, Neilan C, Chien C-C, et al. (2010) Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol Pharmacol* 77: 695–703. doi:10.1124/mol.109.057083.
62. Ferraro L, Frankowska M, Marcellino D, Zaniewska M, Beggiato S, et al. (2012) A novel mechanism of cocaine to enhance dopamine d2-like receptor mediated neurochemical and behavioral effects. An in vivo and in vitro study. *Neuropsychopharmacology* 37: 1856–1866. doi:10.1038/npp.2012.33.
63. Xu Y-T, Robson MJ, Szeszel-Fedorowicz W, Patel D, Rooney R, et al. (2012) CM156, a sigma receptor ligand, reverses cocaine-induced place conditioning and transcriptional responses in the brain. *Pharmacol Biochem Behav* 101: 174–180. doi:10.1016/j.pbb.2011.12.016.

3.3 El tratamiento de L-DOPA en primates afecta a la expresión de los heterómeros de receptores de adenosina A_{2A} – cannabinoide CB₁ – dopamina D₂ en el núcleo caudado.

Jordi Bonaventura^{a,b,1}, Alberto J. Rico^{b,c,1}, Estefanía Moreno^{a,b}, Salvador Sierra^{b,c}, Marta Sánchez^{a,b}, Natasha Luquin^{b,c}, Daniel Farré^{a,b}, Christa E. Müller^d, Eva Martínez-Pinilla^c, Antoni Cortés^{a,b}, Josefa Mallol^{a,b}, Marie-Therese Armentero^e, Annalisa Pinna^f, Enric I. Canela^{a,b}, Carme Lluís^{a,b}, Peter J. McCormick^{a,b}, José L. Lanciego^{b,c}, Vicent Casadó^{a,b,1}, Rafael Franco^{a,c,1}

a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, Barcelona, España

b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, España

c Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona, España

d PharmaCenter Bonn, Pharmaceutical Institute, Pharmaceutical Chemistry I, University of Bonn, Alemania

e Laboratory of Functional Neurochemistry, C. Mondino National Neurological Institute, via Mondino 2, Pavia, Italia

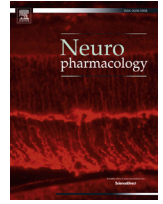
f CNR Institute of Neuroscience, Cagliari, Italia

1 Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Manuscrito publicado en Neuropharmacology. 2013 Nov 11; 79C: 90-100.

Las bases moleculares del detonante, en la enfermedad de Parkinson, de las discinesias inducidas por L-DOPA, las cuales dependen del control motor de la vía indirecta, no son aún conocidas. En roedores, la vía indirecta contiene neuronas GABAérgicas estriatopallidales que expresan heterotrímeros compuestos por receptores A_{2A} de adenosina, CB₁ de cannabinoide y D₂ de dopamina, que regulan la neurotransmisión dopaminérgica. Este trabajo fue diseñado para investigar la expresión de estos heterómeros en el estriado del modelo de primate de la enfermedad de Parkinson y determinar si su expresión y propiedades farmacológicas están alteradas tras el tratamiento de L-DOPA. Usando la recientemente desarrollada técnica de la *in situ Proximity Ligation Assay* (PLA) y la identificación de la huella heteromérica bioquímica, hemos descubierto una distribución regional de los heterómeros de receptores A_{2A}-CB₁-D₂ que predice la neurotransmisión diferencial dependiente del receptor D₂ en el caudado-putamen de *Macaca fascicularis*. Mientras los heterómeros son abundantes en el núcleo caudado de monos tanto *naïve* (controles) como tratados

con MPTP, el tratamiento con L-DOPA enmascaró la huella bioquímica del heterómero y condujo a una débil expresión del heterómero. Estos resultados constituyen la primera evidencia de expresión heteromérica alterada bajo condiciones patológicas, y sugieren que los fármacos contra el heterómero de receptores A_{2A} - CB_1 - D_2 podrían ser beneficiosos para normalizar tanto el *output* de los ganglios basales como prevenir los efectos secundarios inducidos por L-DOPA.



L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine–CB₁ cannabinoid–D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus

Jordi Bonaventura^{a,b,1}, Alberto J. Rico^{b,c,1}, Estefanía Moreno^{a,b}, Salvador Sierra^{b,c}, Marta Sánchez^{a,b}, Natasha Luquin^{b,c}, Daniel Farré^{a,b}, Christa E. Müller^d, Eva Martínez-Pinilla^c, Antoni Cortés^{a,b}, Josefa Mallol^{a,b}, Marie-Therese Armentero^e, Annalisa Pinna^f, Enric I. Canela^{a,b}, Carme Lluís^{a,b}, Peter J. McCormick^{a,b}, José L. Lanciego^{b,c}, Vicent Casadó^{a,b,**,1}, Rafael Franco^{a,c,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

^c Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

^d PharmaCenter Bonn, Pharmaceutical Institute, Pharmaceutical Chemistry I, University of Bonn, Germany

^e Laboratory of Functional Neurochemistry, C. Mondino National Neurological Institute, via Mondino 2, Pavia, Italy

^f CNR Institute of Neuroscience, Cagliari, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2013

Received in revised form

21 October 2013

Accepted 23 October 2013

Keywords:

Caudate

Putamen

L-Dopa

Dopamine

Parkinson's disease

Receptor heteromer

Striatum

ABSTRACT

The molecular basis of priming for L-DOPA-induced dyskinesias in Parkinson's disease (PD), which depends on the indirect pathway of motor control, is not known. In rodents, the indirect pathway contains striatopallidal GABAergic neurons that express heterotrimers composed of A_{2A} adenosine, CB₁ cannabinoid and D₂ dopamine receptors that regulate dopaminergic neurotransmission. The present study was designed to investigate the expression of these heteromers in the striatum of a primate model of Parkinson's disease and to determine whether their expression and pharmacological properties are altered upon L-DOPA treatment. By using the recently developed *in situ* proximity ligation assay and by identification of a biochemical fingerprint, we discovered a regional distribution of A_{2A}/CB₁/D₂ receptor heteromers that predicts differential D₂-mediated neurotransmission in the caudate–putamen of *Macaca fascicularis*. Whereas heteromers were abundant in the caudate nucleus of both naïve and MPTP-treated monkeys, L-DOPA treatment blunted the biochemical fingerprint and led to weak heteromer expression. These findings constitute the first evidence of altered receptor heteromer expression in pathological conditions and suggest that drugs targeting A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers may be successful to either normalize basal ganglia output or prevent L-DOPA-induced side effects.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The current model of basal ganglia function (Albin et al., 1989; DeLong, 1990) postulates that stimulation of the direct and indirect striatal efferent pathways provokes motor activation and

motor inhibition, respectively, and that smooth motor performance is the result of the balanced influence of these pathways on the neural activity of the basal ganglia output structures (Kravitz et al., 2010). In Parkinson's disease (PD), the equilibrium of the basal ganglia circuits is lost due to the depletion in striatal dopamine caused by degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons (Lewis et al., 2003; Obeso et al., 2008). As the degenerative process progresses, dopamine replacement therapy becomes necessary to alleviate motor dysfunction. The L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) treatment is the most effective means of improving PD motor symptoms as this compound is converted to dopamine leading to activation of D₁-like and D₂-like dopamine receptors (see

* Corresponding author. CIMA, University of Navarra, Pio XII 55, 31008 Pamplona, Spain. Tel.: +34 948194700; fax: +34 948194715.

** Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail addresses: vcasado@ub.edu (V. Casadó), rfranco@ub.edu, rfranco123@gmail.com (R. Franco).

¹ These authors contributed equally to this work.

Koller, 2000; Hornykiewicz, 2010; Rascol et al., 2011 for review). However, its chronic use is associated with the development of motor complications, including on-off fluctuations and dyskinesias (Bezard et al., 2001). Although the mechanisms underlying these motor complications are not completely understood, L-DOPA-induced dyskinesias (LIDs) are thought to result from the combined effects of nigrostriatal dopaminergic damage and pulsatile L-DOPA treatment (Obeso et al., 2000; Cenci, 2007). Accordingly, much research has focused on identifying compounds that alleviate these abnormal involuntary movements, and the development of non-dopaminergic compounds to be used as adjuvants to L-DOPA therapy in PD has attracted much interest in recent years (Schwarzschild et al., 2006; Fox et al., 2006; Armentero et al., 2011; Gottwald and Aminoff, 2011).

Among several new classes of drugs, A_{2A} adenosine receptor antagonists have emerged as the most promising candidates. We, and others, have described antagonistic interactions between A_{2A} and D₂ or D₃ receptors within heteromers (Hillion et al., 2002; Canals et al., 2003; Ferré et al., 2004; Torvinen et al., 2005; Fuxe et al., 2007; Schiffmann et al., 2007). On the one hand, A_{2A} receptor antagonists may prevent the endogenous adenosine-mediated decrease in D₂ receptor agonist affinity (Ferré et al., 1991; Ferré and Fuxe, 1992; Ferré et al., 2004; Muller and Ferré, 2007; Pinna, 2009). Thus, A_{2A} receptor antagonists may enhance the D₂ receptor-mediated effects by attenuating the tonic adenosine-mediated inhibition of D₂ receptors in A_{2A}–D₂ receptor heteromers (Schwarzschild et al., 2006). On the other hand, blockade of A_{2A} receptors also indirectly enhances the effects of D₁ receptor activation in striatonigral-projecting neurons (Pinna et al., 1996; Pollack and Fink, 1996), suggesting that A_{2A} receptor antagonists exert a facilitatory effect on dopamine transmission that promotes motor activation, and pointing to a potential beneficial effect of these compounds on parkinsonian motor deficits.

Cannabinoid receptors also play a key role in the motor alterations associated with PD. CB₁ receptors are downregulated in the early stages of PD (Sagredo et al., 2007), which may render striatonigral neurons more vulnerable to the cytotoxic stimuli associated with this disease (Sagredo et al., 2007). By contrast, the cannabinoid system becomes overactive in the advanced stages of the disease, when the major PD symptoms appear. This has been demonstrated in humans by analyzing the number and function of CB₁ receptors in *post-mortem* basal ganglia tissue (Lastres-Becker et al., 2001) and by measuring endocannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of PD patients (Pisani et al., 2005). Similar variations in CB₁ receptor levels accompanying the progression of PD have been described in animal models (Garcia-Arencibia et al., 2009). The reversal of these responses with L-DOPA treatment supports the view that overactivation of cannabinoid signaling is inversely correlated with striatal dopaminergic denervation (Romero et al., 2000; Lastres-Becker et al., 2001), strongly suggesting that blocking CB₁ receptors could protect against parkinsonian bradykinesia (Garcia-Arencibia et al., 2009; Orgado et al., 2009). Using a resonance energy transfer based technique (Carriba et al., 2008), we demonstrated previously that CB₁ receptors can form heteromers with A_{2A} adenosine and D₂ dopamine receptors. We described the expression of A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heterotrimers in transfected cells and in the mouse striatum (Navarro et al., 2010). Moreover, we defined the negative modulation of A_{2A} and CB₁ receptor agonists upon dopamine binding to D₂ receptors as a biochemical fingerprint of this heteromer. Another characteristic of this complex is its selective coupling to the mitogen-activated protein kinase pathway (Navarro et al., 2010; Higley and Sabatini, 2010; Marcellino et al., 2008). In the present study, we have analyzed the expression and function of A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers in the striatum of a monkey model of PD and used *in situ* proximity ligation assay (PLA) to directly detect

molecular protein–protein interactions. Accordingly, we demonstrate that A_{2A}–CB₁, A_{2A}–D₂ and CB₁–D₂ receptor heteromerization occurs in the *caudate nucleus* (CN), and to a lesser extent in the *putamen* (Put). These results were confirmed by analyzing the biochemical fingerprint of the A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers at the ligand binding level. The same techniques were used to demonstrate the absence of heteromers in L-DOPA-treated parkinsonian monkeys exhibiting involuntary movements. Taken together, our results demonstrate that such heteromultimers are associated with PD and constitute the first evidence of changes in G-protein-coupled receptor heteromerization during the course of a neurological disease.

2. Materials and methods

2.1. Generation of parkinsonian monkeys and L-DOPA treatment

Animals were supplied by Harlan Laboratories. All animals were naïve before any treatment. For radioligand binding experiments, fresh tissue from a total of 21 young adult male *Macaca fascicularis* primates (between 4 and 5.5 years old) were used. Proximity ligation assays were performed in samples from 6 additional monkeys (see details in 2.2). Animal handling was conducted in accordance with the European Council Directive 86/609/EEC as well as in agreement with the Society for Neuroscience Policy on the Use of Animals in Neuroscience Research. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Navarra (ref: 018/2008) as well as by the Department of Health from the Government of Navarra (ref: NA-UNAV-04-08). Of the 21 animals devoted to perform binding assays in freshly isolated tissue, 11 were naïve and 10 monkeys were treated with systemic delivery of the dopaminergic neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine from Sigma, Madrid, Spain) to induce a bilateral parkinsonian syndrome (Rico et al., 2010). Animals received a weekly injection of MPTP (0.2 mg/kg *i/v*; accumulated doses ranging from 5 to 7 mg/kg) until reaching a non-reversible parkinsonian syndrome. The severity of the MPTP-induced parkinsonism was evaluated using a clinical rating scale (Kurlan et al., 1991). This scale rates parkinsonian motor symptoms such as facial expression (0–3), resting tremor (0–3), action or intention tremor (0–3), posture (0–2), bradykinesia (0–4), balance coordination (0–3), gait (0–3), gross motor skills of the upper limb (0–3) and lower limb (0–3), and defense reaction (0–2) in an accumulating scale where the maximum score (i.e., highest severity) is 29. Once primates reached minimum score of 21 points and above, the MPTP treatment was discontinued for a wash-out period of 2 months to ensure that the parkinsonian syndrome was fully stabilized. At the end of the stabilization period, the PD scores were between 21 and 24 for all primates treated with MPTP. To 3 monkeys with stabilized parkinsonian syndrome (scoring 21, 22 and 24 points in the Kurlan scale), L-DOPA was orally administered (in orange juice) at a dose of 25 mg/kg daily (Madopar® L-DOPA/benserazide, 200:50, Roche). Untreated animals were also administered orange juice. The changes in the score of Kurlan et al. (1991) from the “off” to the “on” state were monitored and the duration of the “on” response recorded (Lanciego et al., 2008). LIDs were rated as 1 (mild), when presented only occasionally under stress; 2 (moderate) for LIDs present during most of the “on” period without interfering with voluntary movements; and 3 (severe) when LIDs were continuous, generalized and they perturbed motor behavior. This scoring system is in keeping with the scale included in the Core Assessment Program for Intracerebral Transplantation for Parkinson's disease (Langston et al., 1992), subsequently modified and validated for the assessment of dyskinesias in patients (Goetz et al., 1994). By the time of sacrifice, all 3 monkeys treated with L-DOPA showed severe dyskinesia. These primates entered in the “on” state 30 min post-L-DOPA oral delivery and the duration of the “on” period was maintained for 2.5–3 h. Animals were treated daily with L-DOPA until they showed an overt dyskinetic syndrome; a mild dyskinetic syndrome was displayed by the end of the first month of treatment and the overt dyskinetic symptoms appeared one month later and remained stable until sacrifice. In all cases, primates were sacrificed by decapitation after an intravenous overdose of T61 (terminal anesthesia, 0.3 mg/kg). L-DOPA-treated animals were killed in the on state, when they showed peak-of-dose dyskinesia. The skull was opened, and the brain extracted, blocked on ice, and the areas of interest (CN and the pre- and post-commissural Put) were removed from the brain under a dissection microscope, stored in Eppendorf vials, quickly frozen on dry ice and preserved at –80° C until use. Basal ganglia-related structures were selected according to the atlas of Lanciego and Vazquez (2012). Blocks containing the *substantia nigra pars compacta* (SNc) were fixed by immersion and finally stained using antibodies against tyrosine hydroxylase to assess the degree of dopaminergic neuronal death induced by the MPTP treatment. The extent of the induced nigrostriatal lesion was very similar for all MPTP-treated monkeys and a representative image is shown in Supplementary Fig. 1.

2.2. *In situ* proximity ligation assays (PLA)

PLA experiments were carried out by using paraformaldehyde-fixed, sagittal sections (40 μm-thick) available in our monkey brain bank. Briefly, sagittal sections

through the caudate nucleus and putamen from 6 additional monkeys (2 control, 2 parkinsonian and 2 dyskinetic), with similar features as those displayed by the animals used in binding experiments, were used. Samples were mounted on gelatin-coated slides and further processed for the PLA technique. Briefly, A_{2A}-D₂, CB₁-D₂, and A_{2A}-CB₁ heteromers were detected using the Duolink II *in situ* PLA detection Kit (Olink; Bioscience, Uppsala, Sweden). Slices were thawed at 4 °C, washed in 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized with TBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min and successively washed with TBS. After 1 h incubation at 37 °C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber (37 °C), slices were incubated overnight in the antibody diluent medium with a mixture of equal amounts of mouse monoclonal anti-A_{2A} receptor antibody (1:200, ref. 05-717; Millipore, Billerica, MA, USA; Rosin et al., 1998) and rabbit polyclonal anti-CB₁ receptor antibody (1:200, ref. PA 1-745, Thermo Scientific, Rockford, USA) to detect A_{2A}-CB₁ receptor heteromers or the rabbit polyclonal anti-D₂ receptor antibody (1:200, ref. AB5084P; Millipore) and monoclonal mouse anti-A_{2A} receptor antibody to detect A_{2A}-D₂ receptor heteromers. Slices were washed as indicated by the supplier and incubated for 2 h in a pre-heated humidity chamber at 37 °C with PLA probes detecting mouse or rabbit antibodies, Duolink II PLA probe anti-mouse plus and Duolink II PLA probe rabbit minus (prepared following the instructions of the supplier) diluted in the antibody diluent to a concentration of 1:5. To detect CB₁-D₂ receptor heteromers, slices were incubated with a mixture of equal amounts of the polyclonal rabbit anti-CB₁ receptor antibody (1:100) and the polyclonal rabbit anti-D₂ receptor antibody (1:100) directly coupled to DNA chain plus or DNA chain minus, respectively, following the instructions of the supplier. After washing at room temperature, slices were incubated in a pre-heated humidity chamber for 30 min at 37 °C, with the ligation solution (Duolink II Ligation stock 1:5 and Duolink II Ligase 1:40). Detection of the amplified probe was done with the Duolink II Detection Reagents Red Kit. After exhaustively washing at room temperature as indicated in the kit, slices were mounted using a DAPI-containing mounting medium. The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (N.A. 1.4), and a 405 nm and a 561 nm laser lines. For each field of view a stack of two channels (one per staining) and 9 to 15 Z stacks with a step size of 1 μm were acquired. A quantification of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and, in cells containing spots, the ratio *r* (number of red spots/cell), were determined considering a total 300–400 cells from six different fields within striatum from two different animals per group using the Fiji package (<http://pacific.mpi-cbg.de/>). Nuclei and red spots were counted on the maximum projections of each image stack. After getting the projection each channel was processed individually. The nuclei were segmented by filtering with a median filter, subtracting the background, enhancing the contrast with the Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) plug-in and finally applying a threshold to obtain the binary image and the regions of interest (ROI) around each nucleus. Red spots images were also filtered and thresholded to obtain the binary images. Red spots were counted in

(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions to build up the standard curve.

2.4. Radioligand binding assays

Binding experiments were performed incubating monkey cerebral membrane suspensions (0.2 mg of protein/ml) for 2 h at 25 °C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM MgCl₂ and 0.2 I.U./ml (1 μg/ml) of ADA (EC 3.5.4.4; Roche, Basel, Switzerland). For competition experiments, this membrane suspensions were incubated with a constant free concentration of [³H]ZM 241385 (4 nM; 50.0 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA), [³H]YM-09151-2 (0.5 nM; 84.4 Ci/mmol, PerkinElmer, Boston, MA, USA) or [³H]CP 55940 (6 nM; 144 Ci/mmol, PerkinElmer) and increasing concentrations of the competitors ZM 241385 (Tocris, Bristol, UK), dopamine (Sigma) or CP 55940 (Tocris), for the determination of A_{2A}, D₂ or CB₁ receptors, respectively. All incubates with [³H]CP 55940 were performed in low binding tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) containing 1 mg/ml fatty-acid-free BSA (Sigma). When indicated, competition experiments were developed in the presence of a constant concentration of a ligand acting as modulator, 250 nM CGS 21680 (Sigma) or 100 nM CP 55940. Nonspecific binding was determined in the presence of 50 μM ZM 241385, YM-09151-2 (Tocris) or CP 55940 added prior to the radioligand. Free and membrane-bound ligand were separated by rapid filtration of 500 μl aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% polyethylenimine (Sigma) that were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer. All incubates with [³H]CP 55940 were filtered through filters embedded in 50 mM Tris-HCl buffer containing 1 mg/ml fatty-acid-free BSA, without polyethylenimine, and washed twice with 4 ml of this same buffer. In all cases, the filters were incubated with 10 ml of Ecocint H scintillation cocktail (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) overnight at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (PerkinElmer) with an efficiency of 62%.

2.5. Binding data analysis

Radioligand competition curves were analyzed by nonlinear regression using the commercial Grafit curve-fitting software (Eritacus Software, Surrey, UK), by fitting the binding data to the mechanistic two-state dimer receptor model (Casadó et al., 2007, 2009). Since there is now abundant evidence for GPCR homomerization at the membrane level, including A_{2A}, D₂ and CB₁ receptors (Ferré et al., 2009b), this model considers a homodimer as the minimal structural unit of the receptor. Here, we consider the possibility of a homodimer as the minimal structural unit of a receptor forming homomers or forming heteromers with another receptor. To calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants the following equation for a competition binding experiment deduced previously (Franco et al., 2006) was considered:

$$A_{\text{total bound}} = \left(K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB} \right) R_T / \left(K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B / K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B^2 / (K_{DB1}K_{DB2}) \right) + A_{\text{non-specific bound}} \quad (1)$$

each of the ROIs obtained in the nuclei images. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* multiple comparison test was used to compare the values (% of positive cells or *r* – spots/cell) obtained for each pair of receptors in different disease states or in different striatal regions.

2.3. Brain striatal membranes preparation and protein determination

Monkey cerebral tissue was disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 7 rotor, setting 5; Kinematica, Basel, Switzerland) for three 5 s-periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/1000). After eliminating cell debris by centrifugation at 1000 g for 10 min, membranes were obtained by centrifugation at 105,000 g (40 min, 4 °C). Membranes were washed in the same medium and the pellet was obtained by centrifugation under the same conditions and stored at –80 °C until use (Casadó et al., 1990). Membranes were thawed, washed once more and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Protein was quantified by the bicinchoninic acid method

where A represents free radioligand (A_{2A}, D₂ or CB₁ receptor ligands: [³H]ZM 241385, [³H]YM-09151-2 or [³H]CP 55940, respectively) concentration, R_T is the total amount of receptor dimers and K_{DA1} and K_{DA2} are the macroscopic equilibrium dissociation constants describing the binding of the first and the second radioligand molecule (A) to the dimeric receptor; B represents the assayed competing compound concentration, and K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the macroscopic equilibrium dissociation constants for the binding of the first competitor molecule (B) to a dimer and for the binding of the second competitor molecule (B) to the semi-occupied dimer; K_{DAB} is the hybrid equilibrium radioligand/competitor dissociation constant, which is the dissociation constant of B binding to a receptor dimer semi-occupied by A.

Since the radioligand A ([³H]ZM 241385, [³H]YM-09151-2 or [³H]CP 55940) shows non-cooperative behavior, eq. (1) can be simplified to eq. (2) due to the fact that K_{DA2} = 4K_{DA1} (Casadó et al., 2007, 2009); and, therefore, K_{DA1} is enough to characterize the binding of the radioligand A:

$$A_{\text{total bound}} = \left(4K_{DA1}A + 2A^2 + 4K_{DA1}AB / K_{DAB} \right) R_T / \left(4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB / K_{DAB} + 4K_{DA1}^2 B / K_{DB1} + 4K_{DA1}^2 B^2 / (K_{DB1}K_{DB2}) \right) + A_{\text{non-specific bound}} \quad (2)$$

2.6. Binding data – statistical analysis

Goodness of fit was tested according to reduced chi-squared value given by the Graft program. The test of significance for two different model population variances was based upon the *F*-distribution. Using this *F*-test, a probability greater than 95% ($p < 0.05$) was considered the criterion to select a more complex model (cooperativity) over the simplest one (non-cooperativity). Competition curves for each animal were performed in triplicates to obtain accurate parameter values. Data in tables are the mean \pm SEM of parameters obtained using samples from 11 control animals, 7 MPTP-treated animals or 3 dyskinetic animals. Differences were analyzed for significance by two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* multiple comparison test considering preincubation with vehicle or different ligands as one factor and different disease states or different striatal regions as another factor. For one-factor comparisons, one-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* multiple comparison test was applied.

3. Results

3.1. Expression of A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in the monkey striatum

Having previously demonstrated the presence of A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in transfected cells and in the mouse brain (Navarro et al., 2010), in the present study, we explored the expression of this heteromer in the striatum of *M. fascicularis*, taking advantage of the fact that the regions of interest within the striatum are more clearly delineated in the brains of primates than in mice. To identify the precise locations of these heteromer

complexes, the CN was separated from the Put and the interactions between A_{2A} , CB_1 and D_2 receptors were analyzed by *in situ* PLA. This technique permits the direct detection of molecular interactions between two proteins. Labeling heterodimers by PLA requires both receptors to be sufficiently close to allow the two antibody–DNA probes to form double stranded segments (<17 nm), a signal that is further amplified in the presence of fluorescent nucleotides (Soderberg et al., 2008; Trifilieff et al., 2011). Thus, the detection of a punctate fluorescent signal by confocal microscopy is dependent on the close proximity of the receptors. In these experiments, specific primary antibodies directed against each of the three receptors were used: a rabbit anti- CB_1 receptor antibody whose specificity has been described previously (Callen et al., 2012), as well as a mouse anti- A_{2A} antibody and a rabbit anti- D_2 receptor antibody that have been characterized previously for PLA (Trifilieff et al., 2011). By incubating monkey CN slices with these antibodies we observed the formation of A_{2A} – CB_1 (Fig. 1A), A_{2A} – D_2 (Fig. 1B) and CB_1 – D_2 (Fig. 1C) heteromers, visible as red spots in neurons with DAPI-stained nuclei. In all cases, staining was observed in a relatively high percentage of cells (approximately 60%), each having 2.3–2.7 red spots/cell (Fig. 1G). Although PLA can only assess interaction of two proteins and cannot directly demonstrate the presence of heterotrimers, the fact that the percentage of positive cells and the number of red spots/cell were similar ($p > 0.05$) for the three pairs of receptors (A_{2A} – CB_1 , A_{2A} – D_2

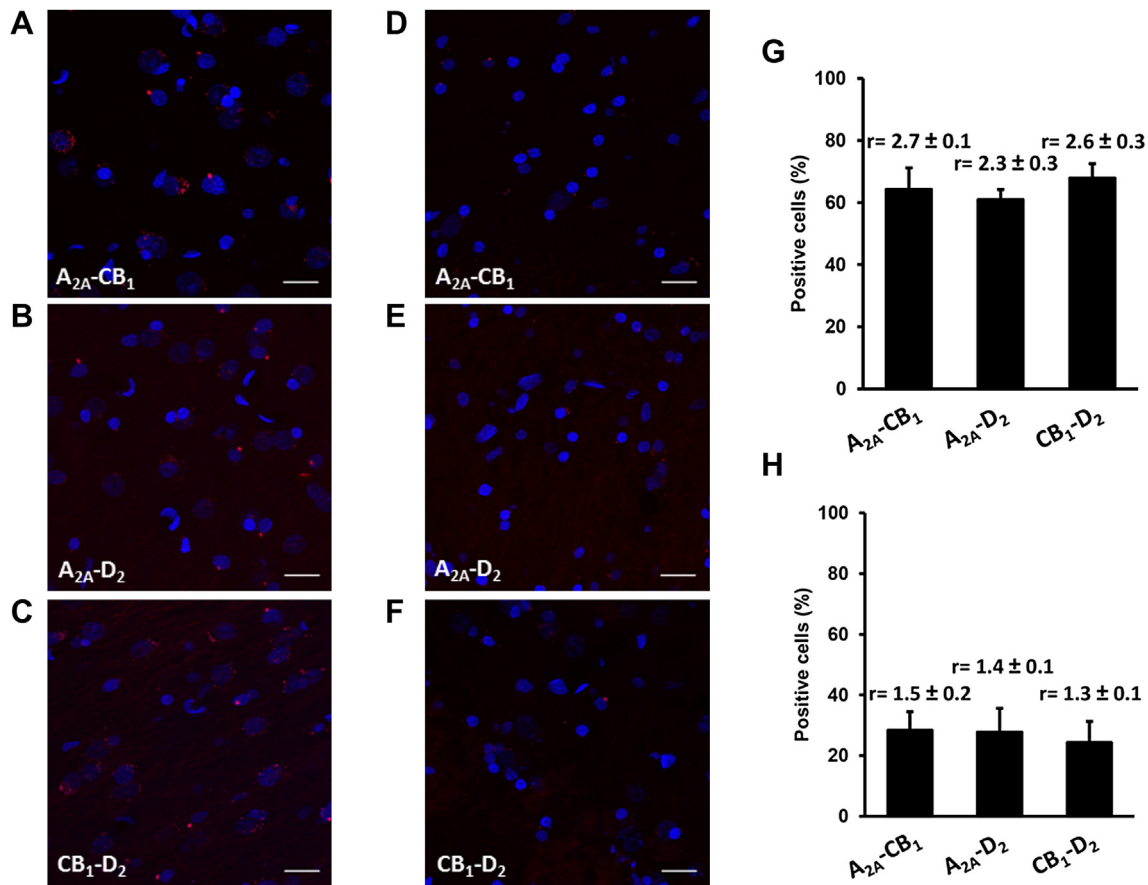


Fig. 1. A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromer expression in the monkey striatum. *In situ* proximity ligation assays (PLA) were performed as described in the Materials and Methods using slices of monkey CN (A to C) or Put (D to F), and primary antibodies for A_{2A} and CB_1 (A and D), A_{2A} and D_2 (B and E), or CB_1 and D_2 (C and F) receptors. Confocal microscopy images are shown (superimposed sections) in which heteromers appear as red clusters in A, B and C only. Scale bars = 20 μ m. In all cases, cell nuclei were stained with DAPI (blue). The number of cells containing one or more red spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus) in the CN (G) and Put (H). *r* (number of red spots/cell) were counted only in cells that contained red spots and are shown above each bar. Data (% of positive cells or *r*) are the mean \pm SEM of counts in 12 different fields (see Methods). From data taken from 12 fields, two-way ANOVA analysis showed significant between-region differences on positive cell or spots/cell values ($p < 0.0001$). Bonferroni's *post hoc* test showed a statistically significant decrease of cells expressing the three pairs of heteromers in Put versus CN ($p < 0.001$ in all cases).

and CB₁–D₂) in the CN and in the Put, suggests that A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heterotrimers are expressed in the striatum. Very importantly, the number of positive cells or *r* (red spots/cell) values corresponding to A_{2A}–CB₁ (Fig. 1D), A_{2A}–D₂ (Fig. 1E) and CB₁–D₂ (Fig. 1F) heteromers was significantly reduced ($p < 0.001$ in all cases) in Put slices compared with the CN (Fig. 1H), indicating a lower expression of the heteromer in the Put. No red spots were observed in slices treated with only one primary antibody and the secondary antibody-DNA probes (Supplementary Fig. 2).

A common characteristic of receptor heteromers is that ligand binding to one receptor can modulate ligand binding to the partner receptor in the heteromer (Ferré et al., 2009a; Gonzalez et al., 2012). This biochemical cross-talk constitutes a fingerprint of the heteromer and has been described for A_{2A}–D₂ receptor heteromers in which agonist binding to A_{2A} receptors modulates the agonist affinity of D₂ receptors (Ferré et al., 1991, 2007). Thus, we sought to identify cross-talk between A_{2A}, CB₁ and D₂ receptors at the ligand binding level in monkey CN and Put membranes. Competition experiments were performed on monkey CN membranes to measure the binding of 0.5 nM radiolabeled D₂ receptor antagonist [³H]YM-09151-2 at increasing dopamine concentrations (0.01 nM–30 μM) in the presence or absence of the A_{2A} receptor agonist CGS 21680

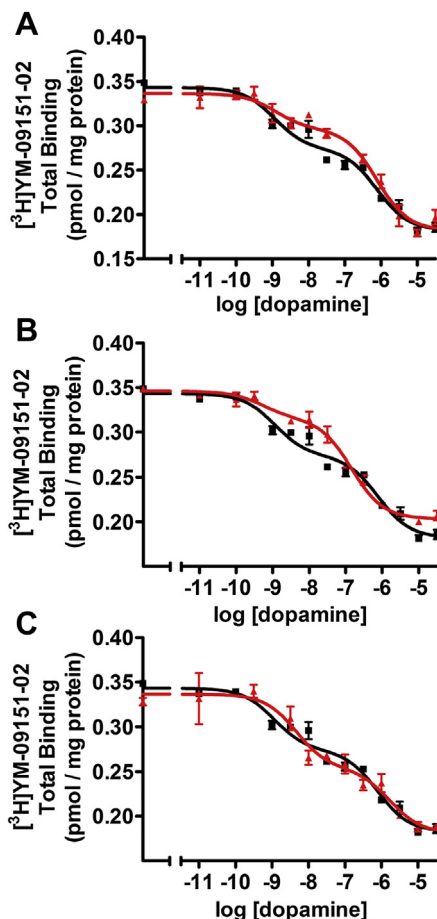


Fig. 2. Competition curves of the D₂ receptor antagonist [³H]YM-09151-2 binding versus increasing concentrations of unlabeled dopamine. Competition experiments were performed as described in the Materials and Methods using 0.2 mg/ml protein of monkey CN membranes, 0.5 nM [³H]YM-09151-2 and increasing concentrations of dopamine (0.01 nM–30 μM) in the presence (red curves) or absence (black curves) of 250 nM CGS 21680 (A), 100 nM CP 55940 (B), or both (C). Values represent the mean ± SEM from a representative experiment ($n = 3$) performed in triplicate. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(250 nM, Fig. 2A), the CB₁ receptor agonist CP 55940 (100 nM, Fig. 2B), or both (Fig. 2C). Biphasic competition curves were obtained in all conditions and the affinity constants for dopamine binding to the D₂ receptor were calculated by fitting the binding data to equation (2). Binding of both the A_{2A} receptor agonist and the CB₁ receptor agonist induced a decrease in dopamine affinity for D₂ receptors (Table 1). This effect was almost completely reversed when A_{2A} and CB₁ receptor agonists were added simultaneously. Competition experiments under the same conditions were also performed using membranes from the pre- and post-commissural Put. Again, biphasic competition curves were obtained, and affinity constants for dopamine binding to the D₂ receptor were calculated by fitting the binding data to equation (2) (Table 1). No change in dopamine affinity for D₂ receptors was observed following agonist binding to the A_{2A} and/or CB₁ receptor in both the pre- and post-commissural Put. These results are consistent with the above-described PLA results. By statistical analysis it is shown that dopamine binding to D₂ receptors in the CN, but not in the Put, is negatively modulated by the activation of CB₁ or A_{2A} receptors in the heteromer, an effect blocked by co-activation of A_{2A} and CB₁ receptors (Table 1). Importantly, the qualitative changes in receptor heteromerization observed in the different regions were not due to differences in receptor expression. Indeed, the relative expression of A_{2A} and D₂ receptors was very similar in both the CN and Put (Fig. 3), while CB₁ receptor expression was higher in the Put, particularly in the post-commissural Put, with respect to the CN (Fig. 3). Considering the heteromer, binding results may be interpreted as an interprotomer molecular interaction, i.e. an allosteric effect reflecting the conformational change caused by a given agonist on its receptor and transmitted to partner receptors in the heteromer (Gracia et al., 2013). The change in dopamine affinity for D₂ receptors serves to detect the heteromer fingerprint (Ferré et al., 2009a,b) and the disappearance of the allosteric effect on dopamine binding upon simultaneous incubation with A_{2A} and CB₁ receptor agonists suggests differential changes upon co-activation, perhaps a more restricted (“frizzed”) conformation of the macromolecular complex.

Table 1

Effect of A_{2A} and CB₁ receptor agonist on dopamine affinity for D₂ receptors in striatal membranes. Pharmacological parameters obtained from competition experiments.

| Competition experiments [³ H]YM-09151-02 vs dopamine | Parameters | |
|---|-----------------------|-----------------------|
| | K _{DB1} (nM) | K _{DB2} (nM) |
| <i>Caudate nucleus</i> | | |
| Vehicle | 2 ± 1 | 230 ± 80 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 8 ± 2** ^{††} | 580 ± 80 |
| + CP 55940 (100 nM) | 6 ± 2* [†] | 250 ± 130 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 2 ± 1 | 380 ± 180 |
| <i>Pre-commissural put</i> | | |
| Vehicle | 2 ± 1 | 280 ± 100 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 5 ± 2 | 490 ± 130 |
| + CP 55940 (100 nM) | 2 ± 1 | 400 ± 190 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 4 ± 2 | 700 ± 400 |
| <i>Post-commissural put</i> | | |
| Vehicle | 3 ± 1 | 110 ± 80 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 2 ± 1 | 140 ± 20 |
| + CP 55940 (100 nM) | 1.5 ± 0.6 | 90 ± 20 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 3 ± 1 | 120 ± 20 |

K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and the second dopamine binding to the receptor. Two-way ANOVA analysis showed significant between-region differences ($p < 0.05$) on K_{DB1} values and not on K_{DB2} values.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (respect to vehicle) and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (respect to CGS 21680 + CP 55940) after Bonferroni's *post hoc* test.

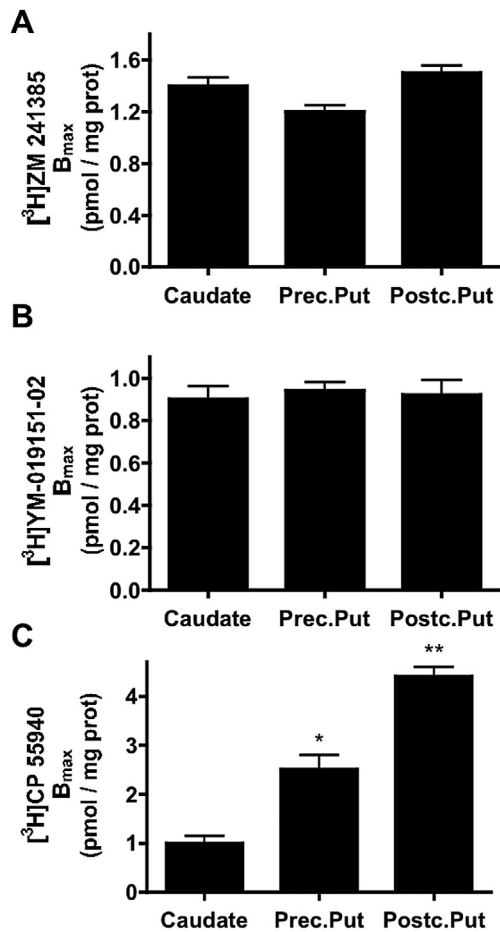


Fig. 3. A_{2A} , CB_1 and D_2 receptor expression in monkey striatum. Maximum binding was calculated in competitive binding experiments using 0.2 mg/ml protein of monkey CN, pre- or post-commissural Put membranes, and an A_{2A} receptor antagonist [3 H]ZM 241385 (4 nM, A), a D_2 receptor antagonist [3 H]YM-09151-2 (0.5 nM, B) or a CB_1 receptor agonist [3 H]CP 55940 (6 nM, C) vs. 50 μ M of the same non-radiolabeled ligands, applying the following affinity constants: 1 nM for ZM 241385, 0.6 nM for YM-09151-2 and 4 nM for CP 55940. Values represent the mean \pm SEM of a representative experiment performed in triplicate. Statistical significance was calculated by one-way ANOVA followed by a Dunnett's *post-hoc* multiple comparison test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ with respect to the CN).

3.2. Expression of A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in the striatum of MPTP-treated monkeys

As A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromers are mainly expressed in the monkey CN, we hypothesized that this complex might play a role in the physiopathology of PD and thus, it may represent a potential therapeutic target. When we first used PLA to analyze the expression of A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromers in CN slices from MPTP-lesioned monkeys, A_{2A} – CB_1 (Fig. 4A), A_{2A} – D_2 (Fig. 4B) and CB_1 – D_2 (Fig. 4C) heteromers were visualized as red spots in several DAPI-stained neurons (Fig. 4D) at levels similar to those found in control monkeys ($p > 0.05$, two-way ANOVA from Figs. 1G and 4D data). These results strongly suggest the presence of A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in the CN of parkinsonian animals. We next investigated the effects of A_{2A} and CB_1 receptor agonists on dopamine affinity for D_2 receptors in the CN of MPTP-lesioned monkeys. Competition experiments were performed to measure the binding of 0.5 nM radiolabeled D_2 receptor antagonist [3 H]YM-09151-2 at increasing dopamine concentrations (0.01 nM–30 μ M) in the presence or absence of 250 nM CGS 21680, 100 nM CP 55940, or both. Biphasic competition curves were obtained in all cases and the affinity

constants for dopamine binding to D_2 receptor were calculated by fitting the binding data to the equation (2) (Table 2). When the same experiment was performed using pre- and post-commissural Put membranes from PD monkeys, the affinity constants obtained for D_2 receptors were similar to those found in naïve animals (Table 2). As seen in non-lesioned monkeys, both A_{2A} and CB_1 receptor agonists decreased the affinity of dopamine for CN D_2 receptors, an effect that was reversed when A_{2A} and CB_1 receptor agonists were added simultaneously. The fact that similar ligand binding behavior was observed for A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in control and PD monkeys suggests that MPTP lesions had no effect on either heteromer expression or intra-heteromer cross-talk.

3.3. Loss of A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromers in the CN of L -DOPA-treated monkeys

While dopamine replacement therapy with L -DOPA remains the most effective way to treat parkinsonian hypokinesia, its chronic use is associated with motor complications that include dyskinesias (Obeso et al., 2000). We investigated the changes that induce a chronic L -DOPA treatment to A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromer function by analyzing A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromer expression by PLA in CN slices from monkeys treated with L -DOPA. We investigated whether chronic L -DOPA treatment altered A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromer function. First, we examined whether there were changes in A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromer expression by PLA in CN slices from monkeys treated with L -DOPA. The expression of A_{2A} – CB_1 (Fig. 5A), A_{2A} – D_2 (Fig. 5B) and CB_1 – D_2 (Fig. 5C) heteromers was dramatically reduced in CN slices from L -DOPA treated monkeys (Fig. 5D) as compared with control and PD monkeys ($p < 0.0001$, two-way ANOVA from Figs. 1G, 4D and 5D data), suggesting a blocking of heterotrimer formation. Second, we investigated receptor cross-talk at the ligand binding level using CN membranes from MPTP- and L -DOPA-treated monkeys. In competitive binding assays similar to those described above to measure ligand binding, biphasic competition curves were obtained in all cases and the affinity constants for dopamine binding to D_2 receptor were calculated by fitting the binding data to the equation (2) (Table 3). In accordance with the decreased heteromer expression seen in the Put (see Fig. 1), dopamine affinity for D_2 receptors was unchanged following agonist binding to A_{2A} or CB_1 receptors in the pre- and post-commissural Put of treated animals (Table 3). Interestingly, the dopamine affinity for CN D_2 receptors was unchanged following agonist binding to A_{2A} and/or CB_1 receptors, indicating a loss of functional cross-talk between receptors, consistent with the loss of heteromer formation observed in the PLA experiments. Two-way ANOVA showed a significant between-group differences ($p < 0.0001$) effect of disease state on K_{DB1} values – not on K_{DB2} values – (data from Tables 1–3) and on percentage of positive cells and spots/cell (r) in CN – not in Put – (data from Figs. 1G, 4D and 5D). The changes in receptor heteromerization in L -DOPA-treated monkeys were not due to decreased receptor expression (Fig. 6). Taken together, these results indicate a loss of heteromer-mediated functional cross-talk following chronic L -DOPA treatment.

4. Discussion

The “receptor heteromer” concept postulates that receptors from the same and different gene families combine with one another to generate complexes with unique biochemical and functional characteristics. This theory is becoming widely accepted for G-protein-coupled receptors and it constitutes an emerging area of interest in the field of receptor signaling (Ferré et al., 2009a). Through heteromerization, receptors generate unique functional entities and novel potential therapeutic targets (Ferré et al., 2007,

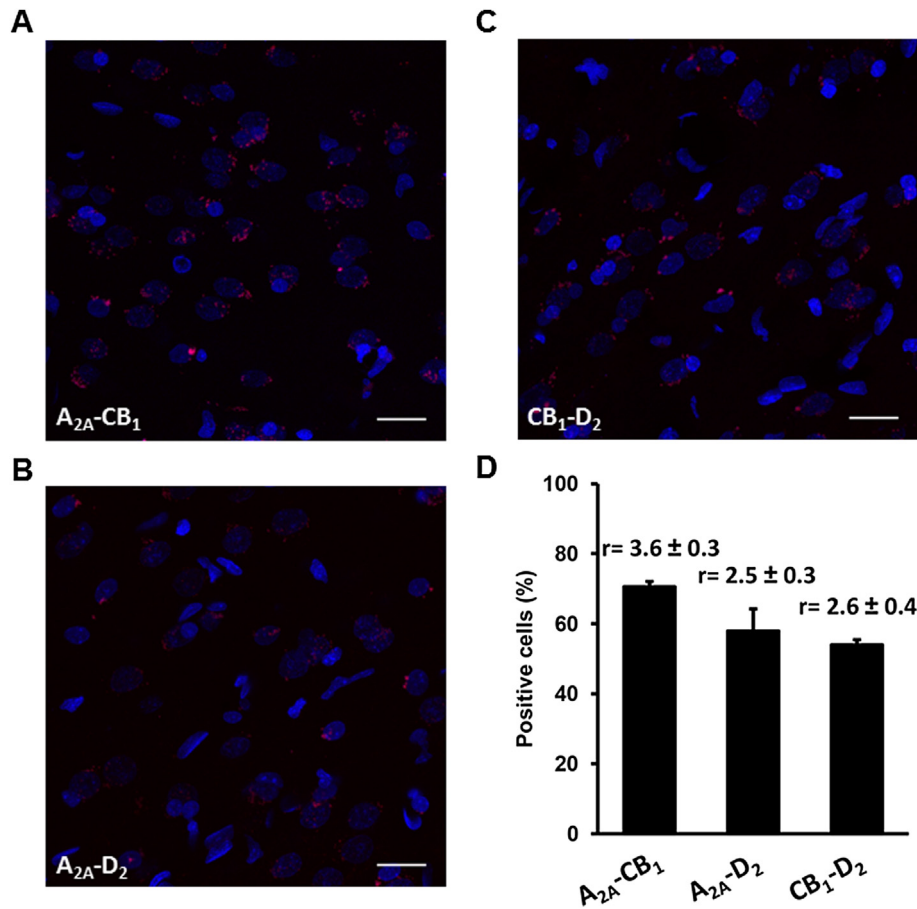


Fig. 4. A_{2A} – CB_1 – D_2 receptor heteromer expression in the CN of MPTP-lesioned monkeys. *In situ* proximity ligation assays (PLA) were performed as described in the [Materials and Methods](#) using CN slices from MPTP-lesioned monkeys and primary antibodies for A_{2A} and CB_1 (A), A_{2A} and D_2 (B), or CB_1 and D_2 (C) receptors. Confocal microscopy images (superimposed sections) are shown in which heteromers appear as red clusters. Scale bars = 20 μ m. In all cases, cell nuclei were stained with DAPI (blue). (D) The number of cells containing one or more red spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nuclei). r values (number of red spots/cell) were counted only in cells that contained red spots and are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean \pm SEM of counts in 12 different fields (see [Methods](#)). From data taken from 12 fields, two-way ANOVA analysis did not show significant differences on positive cell or spots/cell values ($p > 0.05$) respect to naïve control monkeys ([Fig. 1](#)).

Table 2

Effect of A_{2A} and CB_1 receptor agonist on dopamine affinity for D_2 receptors in striatal membranes from PD monkeys. Pharmacological parameters obtained from competition experiments.

| Competition experiments [3H]YM-09151-02 vs. dopamine | Parameters | |
|--|----------------------|-----------------|
| | K_{DB1} (nM) | K_{DB2} (nM) |
| <i>Caudate nucleus</i> | | |
| Vehicle | 6 \pm 2 | 1300 \pm 500 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 19 \pm 2*** \neq | 3000 \pm 1000 |
| + CP 55940 (100 nM) | 18 \pm 3*** \neq | 2500 \pm 800 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 9 \pm 4 | 1300 \pm 600 |
| <i>Pre-commissural put</i> | | |
| Vehicle | | 120 \pm 40 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 5 \pm 1 | 600 \pm 200 |
| + CP 55940 (100 nM) | 3 \pm 1 | 140 \pm 60 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 5 \pm 2 | 500 \pm 100 |
| <i>Post-commissural put</i> | | |
| Vehicle | | 60 \pm 20 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 1 \pm 1 | 200 \pm 60 |
| + CP 55940 (100 nM) | 3 \pm 1 | 300 \pm 100 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 2 \pm 1 | 70 \pm 20 |

K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and the second dopamine binding to the receptor. Two-way ANOVA analysis showed significant between-region differences ($p < 0.001$) on K_{DB1} values and not on K_{DB2} values.

*** $p < 0.001$ (respect to vehicle) and \neq $p < 0.01$ (respect to CGS 21680 + CP 55940) after Bonferroni's *post hoc* test.

2009a; Pin et al. 2007; Dalrymple et al., 2008; Casadó et al., 2009). A large number of heteromers composed of two different receptors have been identified to date (Pin et al. 2007; Dalrymple et al., 2008). We have presented evidence supporting the existence of receptor heteromultimers (i.e., heteromers composed of more than two different receptors), containing A_{2A} adenosine, CB_1 cannabinoid and D_2 dopamine receptors (Carriba et al., 2008; Navarro et al., 2010). The use of mutants in which the quaternary structure of the A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromer is altered has revealed a key biochemical characteristic of this complex: activation of adenosine or cannabinoid receptors within the heteromer negatively modulates D_2 receptor function (Navarro et al., 2010). Although powerful tools are available to identify heteromers in heterologous systems, it remains a challenge to detect heteromer expression in natural tissue. We identified A_{2A} – CB_1 – D_2 heteromers in a natural source using PLA and radioligand binding techniques. As PLA is limited to the direct screening of pairs of receptors, we analyzed all possible combinations for the A_{2A} – CB_1 – D_2 heterotrimeric complex. The PLA data and the cross-talk revealed in binding assays, points to the expression of this complex in the CN of *M. fascicularis*. The occurrence of A_{2A} – CB_1 , CB_1 – D_2 and A_{2A} – D_2 heteromers cannot be ruled out and there is not any tool available to know the proportion of each of the heteromeric species that might coexist in the sample. These findings demonstrate however that some current (dopamine receptor agonists) and experimental (A_{2A} receptor antagonists;

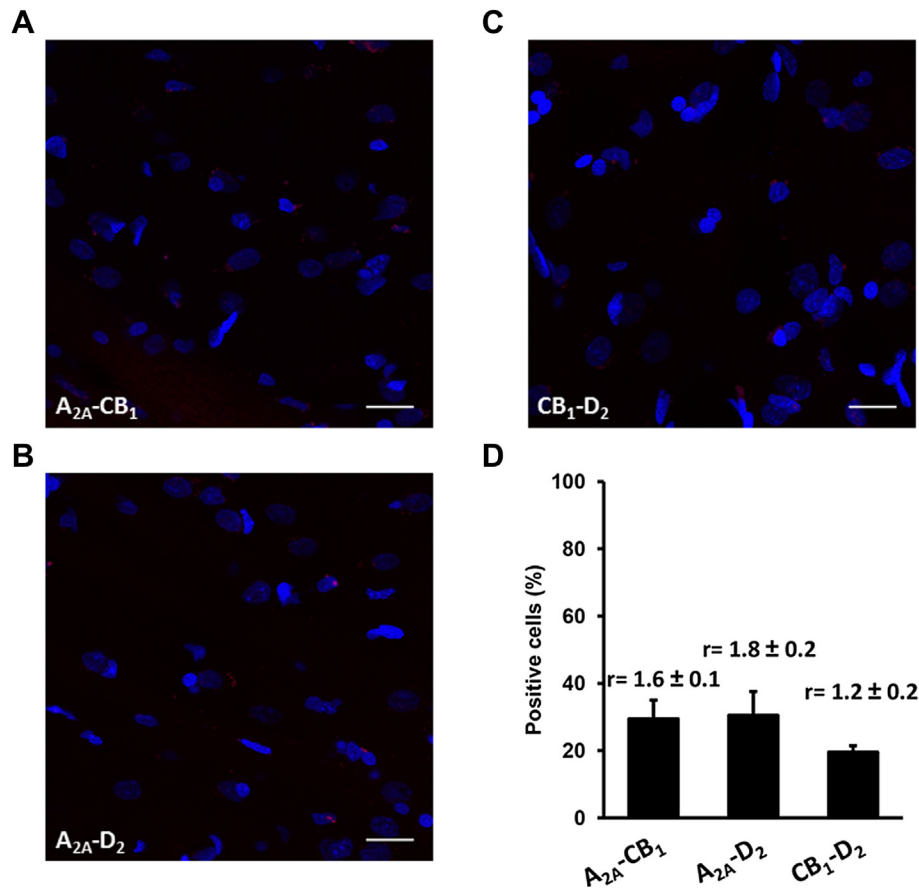


Fig. 5. A_{2A}-CB₁-D₂ receptor heteromer expression in the CN of L-DOPA-treated monkeys. *In situ* proximity ligation assays (PLA) were performed as described in the [Materials and Methods](#) using CN slices from monkeys treated with L-DOPA, and primary antibodies for A_{2A} and CB₁ (A), A_{2A} and D₂ (B), or CB₁ and D₂ (C) receptors. Confocal microscopy images (superimposed sections) are shown in which heteromers appear as red clusters. Scale bars = 20 μm. In all cases, cell nuclei were stained with DAPI (blue). (D) The number of cells containing one or more red spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r* values (number of red spots/cell) were counted only in cells that contained red spots and are shown above each bar. Data (% of positive cells or *r*) are the mean ± SEM of counts in 12 different fields (see [Methods](#)). From data taken from 12 fields, two-way ANOVA analysis showed significant differences on positive cell or spots/cell values (*p* < 0.001) respect to naïve control ([Fig. 1](#)) or PD monkeys ([Fig. 4](#)).

phase II and III clinical trials) anti-parkinsonian therapies target D₂ or A_{2A} receptors that in the CN are expressed as heteromers with themselves and/or with CB₁ receptors. It has been demonstrated ([Orri et al., 2011](#)) that different A_{2A} receptor antagonists may differ

Table 3

Effect of A_{2A} and CB₁ receptor agonist on dopamine affinity for D₂ receptors in striatal membranes from L-DOPA-treated monkeys. Pharmacological parameters obtained from competition experiments.

| Competition experiments [³ H]YM-09151-02 vs. dopamine | Parameters | |
|--|-----------------------|-----------------------|
| | K _{DB1} (nM) | K _{DB2} (nM) |
| <i>Caudate nucleus</i> | | |
| Vehicle | 3 ± 2 | 200 ± 100 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 4 ± 2 | 600 ± 300 |
| + CP 55940 (100 nM) | 3 ± 1 | 500 ± 200 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 3 ± 1 | 360 ± 90 |
| <i>Pre-commissural put</i> | | |
| Vehicle | 4 ± 1 | 230 ± 70 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 8 ± 3 | 280 ± 140 |
| + CP 55940 (100 nM) | 6 ± 2 | 170 ± 70 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 8 ± 5 | 430 ± 130 |
| <i>Post-commissural put</i> | | |
| Vehicle | 7 ± 1 | 120 ± 50 |
| + CGS 21680 (250 nM) | 10 ± 4 | 260 ± 50 |
| + CP 55940 (100 nM) | 7 ± 1 | 200 ± 70 |
| + CGS 21680 + CP 55940 | 7 ± 5 | 220 ± 100 |

K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and the second dopamine binding to the receptor. Two-way ANOVA analysis showed no significant between-region differences (*p* > 0.05) on K_{DB1} or K_{DB2} values.

in the action exerted depending on a preferential pre- versus postsynaptic location of A_{2A} receptor-containing heteromers. Whereas in striatum A₁-A_{2A} receptor heteromers are presynaptically located in glutamatergic terminals of cortical neurons, A_{2A}-CB₁-D₂ receptor heteromers are postsynaptically located in the spines of GABAergic enkephalinergic neurons. Targeting pre- versus postsynaptic A_{2A} receptors, or vice versa, may represent a useful approach to differentially combat disorders affecting the basal ganglia.

Neurons can differentially express heteromers to achieve a diversity of neurotransmitter-mediated actions. According to the basal ganglia model ([Albin et al., 1989](#); [DeLong, 1990](#)), the CN and the Put form part of distinct but parallel cortico-basal ganglia-thalamocortical loops ([Alexander and Crutcher, 1990](#)). Accordingly, the post-commissural Put primarily mediates motor-related information processing, while the CN forms part of the associative and limbic loops. Results from recent high-resolution functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies, performed during a reward- and punishment-based probabilistic associative learning task, have revealed functional specialization within the striatum (ventral Put vs. dorsal CN: [Mattfeld et al., 2011](#)). As the fingerprint of D₂-A_{2A}-CB₁ receptor heteromer was identified in the CN but not in the Put, differential D₂-mediated dopaminergic neurotransmission may occur in different striatal areas in primates. Indeed, the A_{2A}-CB₁-D₂ receptor heteromer becomes an instrument for adenosine or cannabinoid modulation of dopamine binding to D₂

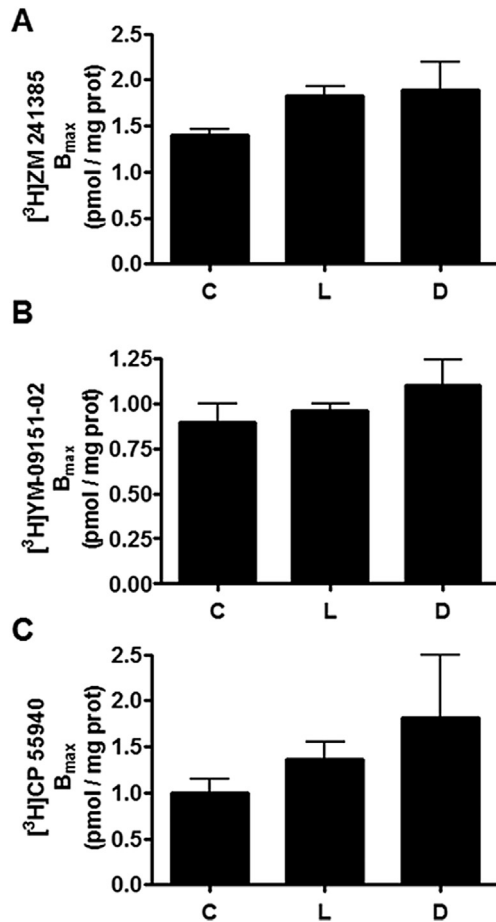


Fig. 6. A_{2A}, CB₁ and D₂ receptor expression in the CN of non-lesioned, MPTP-lesioned and L-DOPA-treated monkeys. Maximum binding was determined from monophasic competition curves obtained using an A_{2A} receptor antagonist [³H]ZM 241385 (4 nM, A), a D₂ receptor antagonist [³H]YM-09151-2 (0.5 nM, B) or a CB₁ receptor agonist [³H]CP 55940 (6 nM, C) and using 50 μM of the same non-radiolabeled ligand as competitor. For maximum binding calculation the following affinity constants were considered: 1 nM for ZM 241385, 0.6 nM for YM-09151-2 and 4 nM for CP 55940. CN membranes (0.2 mg protein/ml) from non-lesioned (C), MPTP-lesioned (L) and L-DOPA-treated (D) monkeys were analyzed. Values represent the mean ± SEM of a representative experiment performed in triplicate.

receptors in specific parts of the striatum, where heteromer expression is associated with a significant qualitative change in coupling to the mitogen-activated protein kinase pathway (Navarro et al., 2010; Higley and Sabatini, 2010; Marcellino et al., 2008). Receptor expression in different areas of the striatum revealed that the low levels of heteromer formation in the Put vs. the CN cannot be explained by variations in the total amount of the individual components. This lack of significant differences in receptor expression is also consistent with previous data obtained by *in situ* hybridization, immunohistochemistry, autoradiography and PET scans (see Morelli et al., 2007 for review). Hence, we propose that the abundance of A_{2A}–CB₁–D₂ heteromers described here in anatomically diverse areas of the striatum may underlie the differential dopaminergic neurotransmission in these regions.

We recently reported that heteromer formation and function can be regulated by physiological conditions, such as circadian rhythms (Gonzalez et al., 2012). However, no changes in heteromer formation have been described to date in neurological disorders. It is here shown that heteromer expression in the CN significantly diminished in L-Dopa-treated PD monkeys and that the negative cross-talk between receptors is abolished. Similar to the lack of

receptor downregulation in dyskinetic patients treated for months or years with L-DOPA (Kumar et al., 2003; de la Fuente-Fernandez et al., 2004; Mishina et al., 2011) the loss of heteromerization in the present study was not due to reduced receptor expression. Processes regulating heteromer formation/disruption may include gene regulation, coordinated mRNA translation, neurotransmitter-induced internalization of cell surface complexes or subsequent endosomal sorting and recycling. In PD patients with L-DOPA-induced dyskinesias, PET imaging studies demonstrated reduced dopamine transporter expression (de la Fuente-Fernandez et al., 2004) and higher levels of striatal synaptic dopamine (Troiano et al., 2009). Interestingly, activated dopamine receptors are internalized faster when heteromerizing with adenosine receptors (Gines et al., 2000). Further studies will be necessary to determine whether dopamine induces the down-regulation of cell surface heteromers, followed by intracellular processing, disruption of the complex and sequestering of D₂ receptors in intracellular compartments. Sequestration of D₂ receptors may also contribute to the loss of efficacy provoked by prolonged L-DOPA treatment.

While a role for adenosine and endocannabinoids has been demonstrated in the development of L-DOPA induced dyskinesias, the mechanisms involved remain unclear, and the efficacy of A_{2A} or CB₁ receptor antagonists in preventing or delaying the appearance of L-DOPA induced complications is yet to be established (see Iravani and Jenner, 2011). The loss of A_{2A}–CB₁–D₂ heteromers in the CN of L-DOPA animals affects the adenosine and cannabinoid modulation of dopamine affinity for D₂ receptors. Moreover, the characteristic and specific coupling of the striatal heteromer to the MAP kinase pathway may also be altered in these animals. Studies in knockout mice have demonstrated that extracellular signal-regulated MAP kinase signaling is linked to the induction of striatal learning (Mazzucchelli et al., 2002). Due to strict limitations on the availability of primates and brain tissue, we were unable to perform either acute L-DOPA treatment with subsequent sacrifice of more animals or MAP kinase assays. However, it has been shown that the formation of A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers is necessary to achieve a specific level of phospho-ERK1/2 expression (Navarro et al., 2010).

Despite it is not possible to know whether heterotrimer disruption is cause or consequence of dyskinesia, important conclusions may be drawn from our data. First, A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers are expressed in the CN of parkinsonian monkeys. Second, variations in heteromer expression predict differential dopaminergic neurotransmission in CN and Put of the primate striatum. Third, the expression of heteromers formed by A_{2A}, CB₁ and/or D₂ receptors is dramatically diminished in the CN of animals receiving chronic L-DOPA treatment, providing the first evidence of altered heteromer expression during the course of a human disease. A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers are postsynaptic expressed in the striatopallidal neurons of the indirect pathway (Navarro et al., 2010; Ferré et al., 2011; Orru et al., 2011) where A_{2A} receptors establish reciprocal antagonistic interactions with D₂ receptors, for instance by counteracting D₂ receptor-mediated inhibitory modulation of NMDA effects on these neurons. This may be one of the mechanisms involved in the locomotor depressant and activating effects of, respectively, A_{2A} receptor agonists and antagonists (Ferré et al., 2011). As CB₁ receptor agonists also counteract D₂ receptor signaling (Navarro et al., 2010), the L-DOPA-induced disruption of A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers remove the “molecular brake” that A_{2A} or CB₁ receptors activation exert on D₂ receptor function, thus altering balance between the two efferent pathways of the basal ganglia. The direct pathway, constituted by striatonigral neurons, and the indirect pathway, constituted by striatopallidal neurons, determine the final striatal output and the facilitation and inhibition of specific motor

responses. An imbalance in the indirect pathway due to the lack of the A_{2A} – CB_1 – D_2 -receptor-heteromer functional component, may promote, at least in part, motor alterations associated to dyskinesia. Taken together, these findings provide a better understanding of the role of heteromers containing dopamine and adenosine receptors in the physiopathology of PD and L-DOPA-induced complications, and may contribute to the improvement of current therapeutic strategies to combat PD.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Jasmina Jiménez (Molecular Neurobiology laboratory, Barcelona University) for technical assistance. This study was supported by Grants from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2012-39875-C02-01, SAF2010-18472 and SAF2008-03118-E, within the framework of the Era-NET Neuron program) and a grant for collaborative projects (PI2011/02-7) from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). PJM is a Ramón y Cajal Fellow.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.10.036>.

References

- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12 (10), 366–375.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13 (7), 266–271.
- Armentero, M.T., Pinna, A., Ferré, S., Lanciego, J.L., Muller, C.E., Franco, R., 2011. Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.* 132 (3), 280–299.
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalou, S., Guilloateau, D., et al., 2001. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 21 (17), 6853–6861.
- Callen, L., Moreno, E., Barroso-Chinea, P., Moreno-Delgado, D., Cortes, A., Mallol, J., et al., 2012. Cannabinoid receptors CB_1 and CB_2 form functional heteromers in brain. *J. Biol. Chem.* 287 (25), 20851–20865.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., et al., 2003. Adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 278 (47), 46741–46749.
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., et al., 2008. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* 5 (8), 727–733.
- Casadó, V., Canti, C., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., Franco, R., 1990. Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* 26 (4), 461–473.
- Casadó, V., Cortes, A., Ciruela, F., Mallol, J., Ferré, S., Lluís, C., et al., 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 (3), 343–354.
- Casadó, V., Ferrada, C., Bonaventura, J., Gracia, E., Mallol, J., Canela, E.I., et al., 2009. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem. Pharmacol.* 78 (12), 1456–1463.
- Cenci, M.A., 2007. L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13 (Suppl. 3), S263–S267.
- Dalrymple, M.B., Pflieger, K.D., Eidne, K.A., 2008. G protein-coupled receptor dimers: functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol. Ther.* 118 (3), 359–371.
- de la Fuente-Fernandez, R., Sossi, V., Huang, Z., Furtado, S., Lu, J.Q., Calne, D.B., et al., 2004. Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127 (Pt 12), 2747–2754.
- DeLong, M.R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13 (7), 281–285.
- Ferré, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.B., Fuxe, K., 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D_2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (16), 7238–7241.
- Ferré, S., Fuxe, K., 1992. Dopamine denervation leads to an increase in the intramembrane interaction between adenosine A2 and dopamine D_2 receptors in the neostriatum. *Brain Res.* 594 (1), 124–130.
- Ferré, S., Ciruela, F., Canals, M., Marcellino, D., Burgueno, J., Casadó, V., et al., 2004. Adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuropsychiatric disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.* 10 (5), 265–271.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C., Franco, R., 2007. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 30 (9), 440–446.
- Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durrux, T., et al., 2009a. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* 5 (3), 131–134.
- Ferré, S., Goldberg, S.R., Lluís, C., Franco, R., 2009b. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology* 56 (Suppl. 1), 226–234.
- Ferré, S., Quiroz, C., Orru, M., Guitart, X., Navarro, G., Cortés, A., et al., 2011. Adenosine A(2A) receptors and A(2A) receptor heteromers as key players in striatal function. *Front Neuroanat.* 5, 36.
- Fox, S.H., Lang, A.E., Brotchie, J.M., 2006. Translation of nondopaminergic treatments for levodopa-induced dyskinesia from MPTP-lesioned nonhuman primates to phase IIa clinical studies: keys to success and roads to failure. *Mov. Disord.* 21 (10), 1578–1594.
- Franco, R., Casadó, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferré, S., Fuxe, K., et al., 2006. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol. Pharmacol.* 69 (6), 1905–1912.
- Fuxe, K., Ferré, S., Genedani, S., Franco, R., Agnati, L.F., 2007. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol. Behav.* 92 (1–2), 210–217.
- García-Arencibia, M., García, C., Fernández-Ruiz, J., 2009. Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8 (6), 432–439.
- Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., et al., 2000. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (15), 8606–8611.
- Goetz, C.G., Stebbins, G.T., Shale, H.M., Lang, A.E., Chernik, D.A., Chmura, T.A., et al., 1994. Utility of an objective dyskinesia rating scale for Parkinson's disease: inter- and intrarater reliability assessment. *Mov. Disord.* 9 (4), 390–394.
- Gonzalez, S., Moreno-Delgado, D., Moreno, E., Perez-Capote, K., Franco, R., Mallol, J., et al., 2012. Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D(4) receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol.* 10 (6), e1001347.
- Gottwald, M.D., Aminoff, M.J., 2011. Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 69 (6), 919–927.
- Gracia, E., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Mallol, J., McCormick, P.J., et al., 2013. Homodimerization of adenosine A1 receptors in brain cortex explains the biphasic effect of caffeine. *Neuropharmacology* 71, 56–69.
- Higley, M.J., Sabatini, B.L., 2010. Competitive regulation of synaptic Ca^{2+} influx by D_2 dopamine and A_{2A} adenosine receptors. *Nat. Neurosci.* 13 (8), 958–966.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casadó, V., Scott, R., Terasma, A., et al., 2002. Coaggregation, internalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptors and dopamine D_2 receptors. *J. Biol. Chem.* 277 (20), 18091–18097.
- Hornykiewicz, O., 2010. A brief history of levodopa. *J. Neurosci.* 257 (Suppl. 2), S249–S252.
- Iravani, M.M., Jenner, P., 2011. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *J. Neural Transm.* 118 (12), 1661–1690.
- Koller, W.C., 2000. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 55 (11 Suppl. 4), S2–S7 discussion S8–12.
- Kravitz, A.V., Freeze, B.S., Parker, P.R., Kay, K., Thwin, M.T., Deisseroth, K., et al., 2010. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466 (7306), 622–626.
- Kumar, A., Mann, S., Sossi, V., Ruth, T.J., Stoessl, A.J., Schulzer, M., et al., 2003. [11C]DTBZ-PET correlates of levodopa responses in asymmetric Parkinson's disease. *Brain* 126 (Pt 12), 2648–2655.
- Kurlan, R., Kim, M.H., Gash, D.M., 1991. Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov. Disord.* 6 (2), 111–118.
- Lanciego, J.L., Rodriguez-Oroz, M.C., Blesa, F.J., Alvarez-Erviti, L., Guridi, J., Barroso-Chinea, P., et al., 2008. Lesion of the centromedian thalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Mov. Disord.* 23 (5), 708–715.
- Lanciego, J.L., Vazquez, A., 2012. The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections. *Brain Struct. Funct.* 217 (2), 613–666.
- Langston, J.W., Widner, H., Goetz, C.G., Brooks, D., Fahn, S., Freeman, T., et al., 1992. Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov. Disord.* 7 (1), 2–13.
- Lastres-Becker, I., Cebeira, M., de Ceballos, M.L., Zeng, B.Y., Jenner, P., Ramos, J.A., et al., 2001. Increased cannabinoid CB_1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* 14 (11), 1827–1832.

- Lewis, S.J., Caldwell, M.A., Barker, R.A., 2003. Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 5 (10), 1–20.
- Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., et al., 2008. Antagonistic cannabinoid CB₁/dopamine D₂ receptor interactions in striatal CB₁/D₂ heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 54 (5), 815–823.
- Mattfeld, A.T., Gluck, M.A., Stark, C.E., 2011. Functional specialization within the striatum along both the dorsal/ventral and anterior/posterior axes during associative learning via reward and punishment. *Learn Mem.* 18 (11), 703–711.
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., et al., 2002. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34 (5), 807–820.
- Mishina, M., Ishiwata, K., Naganawa, M., Kimura, Y., Kitamura, S., Suzuki, M., et al., 2011. Adenosine A_{2A} receptors measured with [C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6 (2), e17338.
- Morelli, M., Di Paolo, T., Wardas, J., Calon, F., Xiao, D., Schwarzschild, M.A., 2007. Role of adenosine A_{2A} receptors in parkinsonian motor impairment and L-DOPA-induced motor complications. *Prog. Neurobiol.* 83 (5), 293–309.
- Muller, C.E., Ferré, S., 2007. Blocking striatal adenosine A_{2A} receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2 (1), 1–21.
- Navarro, G., Ferré, S., Cordomi, A., Moreno, E., Mallol, J., Casadó, V., et al., 2010. Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J. Biol. Chem.* 285 (35), 27346–27359.
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Rodríguez, M., Lanciego, J.L., Artieda, J., Gonzalo, N., et al., 2000. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 23 (10 Suppl.), S8–19.
- Obeso, J.A., Rodríguez-Oroz, M.C., Benitez-Temino, B., Blesa, F.J., Guridi, J., Marin, C., et al., 2008. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 23 (Suppl. 3), S548–S559.
- Orgado, J.M., Fernandez-Ruiz, J., Romero, J., 2009. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int. Rev. Psychiatry* 21 (2), 172–180.
- Orru, M., Bakešová, J., Brugarolas, M., Quiroz, C., Beaumont, V., Goldberg, S.R., Lluís, C., Cortés, A., Franco, R., Casadó, V., Canela, E.I., Ferré, S., 2011 Jan 11. Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A_{2A} receptor antagonists. *PLoS One* 6 (1).
- Pin, J.P., Neubig, R., Bouvier, M., Devi, L., Filizola, M., Javitch, J.A., et al., 2007. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol. Rev.* 59 (1), 5–13.
- Pinna, A., di Chiara, G., Wardas, J., Morelli, M., 1996. Blockade of A_{2A} adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur. J. Neurosci.* 8 (6), 1176–1181.
- Pinna, A., 2009. Novel investigational adenosine A_{2A} receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18 (11), 1619–1631.
- Pisani, A., Fezza, F., Galati, S., Battista, N., Napolitano, S., Finazzi-Agro, A., et al., 2005. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann. Neurol.* 57 (5), 777–779.
- Pollack, A.E., Fink, J.S., 1996. Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 743 (1–2), 124–130.
- Rascol, O., Lozano, A., Stern, M., Poewe, W., 2011. Milestones in Parkinson's disease therapeutics. *Mov. Disord.* 26 (6), 1072–1082.
- Rico, A.J., Barroso-Chinea, P., Conte-Perales, L., Roda, E., Gomez-Bautista, V., Gendive, M., et al., 2010. A direct projection from the subthalamic nucleus to the ventral thalamus in monkeys. *Neurobiol. Dis.* 39 (3), 381–392.
- Romero, J., Berrendero, F., Perez-Rosado, A., Manzanares, J., Rojo, A., Fernandez-Ruiz, J.J., et al., 2000. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB₁ receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci.* 66 (6), 485–494.
- Rosin, D.L., Robeva, A., Woodard, R.L., Guyenet, P.G., Linden, J., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 401 (2), 163–186.
- Sagredo, O., Garcia-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., Fernandez-Ruiz, J., 2007. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol. Neurobiol.* 36 (1), 82–91.
- Schiffmann, S.N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R.A., Ferré, S., 2007. Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. *Prog. Neurobiol.* 83 (5), 277–292.
- Schwarzschild, M.A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J.F., Morelli, M., 2006. Targeting adenosine A_{2A} receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 29 (11), 647–654.
- Soderberg, O., Leuchowius, K.J., Gullberg, M., Jarvius, M., Weibrecht, I., Larsson, L.G., et al., 2008. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* 45 (3), 227–232.
- Torvinen, M., Marcellino, D., Canals, M., Agnati, L.F., Lluís, C., Franco, R., et al., 2005. Adenosine A_{2A} receptor and dopamine D₃ receptor interactions: evidence of functional A_{2A}/D₃ heteromeric complexes. *Mol. Pharmacol.* 67 (2), 400–407.
- Trifilieff, P., Rives, M.L., Urizar, E., Piskowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., et al., 2011. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D₂-adenosine A_{2A} receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 51 (2), 111–118.
- Troiano, A.R., de la Fuente-Fernandez, R., Sossi, V., Schulzer, M., Mak, E., Ruth, T.J., et al., 2009. PET demonstrates reduced dopamine transporter expression in PD with dyskinesias. *Neurology* 72 (14), 1211–1216.

3.4 La L-DOPA afecta al *cross-talk* del heterómero de receptores de adenosina A_{2A} - cannabinoide CB₁ – dopamina D₂ en el estriado de ratas hemiparkinsonianas: estudios bioquímicos y comportamentales.

Annalisa Pinna^{a,*}, Jordi Bonaventura^{b,c}, Daniel Farré^{b,c}, Marta Sánchez^{b,c}, Nicola Simola^d, Josefa Mallol^{b,c}, Carme Lluís^{b,c}, Giulia Costa^d, Younis Baqi^e, Christa E. Muller^e, Antoni Cortés^{b,c}, Peter McCormick^{b,c}, Enric I. Canela^{b,c}, Eva Martínez-Pinilla^f, José L. Lanciego^{c,f}, Vicent Casado^{b,c,1}, Marie-Therese Armentero^{g,1}, Rafael Franco^{b,f,1}

a National Research Council of Italy (CNR), Institute of Neuroscience-Cagliari, 09124 Cagliari, Italia

b Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España

c Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, España

d Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, 09124 Cagliari, Italia

e PharmaCenter Bonn, Pharmaceutical Institute, Pharmaceutical Chemistry I, University of Bonn, Alemania

f Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, España

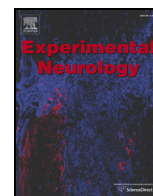
g Laboratory of Functional Neurochemistry, C. Mondino National Neurological Institute, via Mondino 2, Pavia, Italia

1 Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

Manuscrito publicado en Experimental Neurology 2014 Jan 9. Volume 253 (March 2014): 180–191

La terapia a largo plazo con L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) sigue siendo el tratamiento más efectivo en la enfermedad de Parkinson, asociada con graves desórdenes motores como las disquinesias. Los datos experimentales y clínicos obtenidos hasta el momento han mostrado que los antagonistas del receptor A_{2A} de adenosina pueden mejorar la sintomatología potenciando la eficacia de la levodopa y minimizando sus efectos secundarios. Se conoce que los receptores acoplados a proteína G A_{2A} de adenosina, CB₁ de cannabinoide y D₂ de dopamina pueden interaccionar y formar heterómeros funcionales A_{2A}-CB₁-D₂ en células cotransfectadas y estriado de rata. Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con fármacos o compuestos selectivos que actúen sobre los heterómeros de A_{2A}-CB₁-D₂ podría representar una alternativa terapéutica para la enfermedad de Parkinson. En este trabajo, investigamos la expresión de estos heterómeros en el estriado de ratas tanto *naïve* como

hemiparkinsonianas (ratas HPD), portadoras de una lesión unilateral con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), y evaluamos como fueron afectados los niveles de expresión del heterómero y sus propiedades bioquímicas por el tratamiento con levodopa. Los datos que provienen de los experimentos de unión de radioligandos mostraron que los heterómeros de receptores A_{2A} - CB_1 - D_2 están presentes tanto en el estriado de ratas *naïve* como HPD. Sin embargo, los resultados de los estudios de comportamiento indicaron que la administración combinada de antagonistas selectivos de los receptores A_{2A} (MSX-3 o SCH58261) y CB_1 (rimonabanto), en presencia de L-DOPA, no producen una respuesta diferente de la administración sola del antagonista de A_{2A} . Estos resultados de comportamiento dieron lugar a la identificación de los heterómeros en animales tratados con L-DOPA. De manera interesante, los resultados de las uniones de radioligandos en muestras de animales lesionados sugieren que el heterómero desaparece después del tratamiento agudo o crónico con levodopa.



L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}–cannabinoid CB₁–dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies



Annalisa Pinna^{a,*}, Jordi Bonaventura^{b,c}, Daniel Farré^{b,c}, Marta Sánchez^{b,c}, Nicola Simola^d, Josefa Mallol^{b,c}, Carme Lluís^{b,c}, Giulia Costa^d, Younis Baqi^e, Christa E. Müller^e, Antoni Cortés^{b,c}, Peter McCormick^{b,c}, Enric I. Canela^{b,c}, Eva Martínez-Pinilla^f, José L. Lanciego^{c,f}, Vicent Casadó^{b,c,1}, Marie-Therese Armentero^{g,1}, Rafael Franco^{b,f,1}

^a National Research Council of Italy (CNR), Institute of Neuroscience-Cagliari, 09124 Cagliari, Italy

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Spain

^d Department of Biomedical Sciences, University of Cagliari, 09124 Cagliari, Italy

^e PharmaCenter Bonn, Pharmaceutical Institute, Pharmaceutical Chemistry I, University of Bonn, Germany

^f Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

^g Laboratory of Functional Neurochemistry, C. Mondino National Neurological Institute, via Mondino 2, Pavia, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2013

Revised 28 November 2013

Accepted 30 December 2013

Available online 9 January 2014

Keywords:

Parkinson's disease

L-DOPA

G-protein-coupled receptors

A_{2A} antagonists

CB₁ antagonists

Behavior

Radioligand binding

ABSTRACT

Long-term therapy with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), still the most effective treatment in Parkinson's disease (PD), is associated with severe motor complications such as dyskinesia. Experimental and clinical data have indicated that adenosine A_{2A} receptor antagonists can provide symptomatic improvement by potentiating L-DOPA efficacy and minimizing its side effects. It is known that the G-protein-coupled adenosine A_{2A}, cannabinoid CB₁ and dopamine D₂ receptors may interact and form functional A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers in co-transfected cells as well as in rat striatum. These data suggest that treatment with a combination of drugs or a single compound selectively acting on A_{2A}–CB₁–D₂ heteromers may represent an alternative therapeutic treatment of PD. We investigated the expression of A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers in the striatum of both naïve and hemiparkinsonian rats (HPD-rats) bearing a unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesion, and assessed how receptor heteromer expression and biochemical properties were affected by L-DOPA treatment. Radioligand binding data showed that A_{2A}–CB₁–D₂ receptor heteromers are present in the striatum of both naïve and HPD-rats. However, behavioral results indicated that the combined administration of A_{2A} (MSX-3 or SCH58261) and CB₁ (rimonabant) receptor antagonists, in the presence of L-DOPA does not produce a response different from administration of the A_{2A} receptor antagonist alone. These behavioral results prompted identification of heteromers in L-DOPA-treated animals. Interestingly, the radioligand binding results in samples from lesioned animals suggest that the heteromer is lost following acute or chronic treatment with L-DOPA.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: AIMS, abnormal involuntary movements; BG, basal ganglia; BRET, bioluminescence resonance energy transfer techniques; FRET, fluorescence resonance energy transfer techniques; GABA, gamma-amino-butyric acid; HPD-rats, hemiparkinsonian rats (unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats); L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; NI, neurologically intact; 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; PD, Parkinson's Disease; TH, tyrosine hydroxylase; TJMs, tremulous jaw movements; SNC, substantia nigra pars compacta; SRET, sequential resonance energy transfer.

* Corresponding author at: National Research Council of Italy (CNR) Institute of Neuroscience -Cagliari, via Ospedale 72, 09124 Cagliari, Italy. Fax: +39 0706758665.

E-mail address: apinna@unica.it (A. Pinna).

¹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological basal ganglia (BG)-related disorder caused by a progressive degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons and characterized by well-defined motor symptoms, including bradykinesia, rigidity, muscular stiffness, tremor, poor posture and balance, and sensory motor integration deficits (Marsden, 1994; Obeso et al., 2000). The most widely used and highly effective therapy in PD is the treatment with the dopamine precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). After several years of L-DOPA therapy, however, neuropsychiatric and motor complications, including fluctuations in motor response and dyskinesias, develop in the majority of patients (Olanow, 2004). Consequently, one of the main aims in PD research is to identify alternative therapeutic approaches to ameliorate

PD symptoms without inducing motor complications. One of the most promising new non-dopaminergic targets for PD is represented by adenosine A_{2A} receptors (Armentero et al., 2011; Jenner et al., 2009; Müller and Ferré, 2007; Schwarzschild et al., 2006). Evidence indicates that stimulation of A_{2A} receptors, highly co-expressed post-synaptically with the dopamine D_2 receptors in striato-pallidal neurons, decreases the affinity of D_2 receptors in striatal membrane preparations as well as in different cell lines (Dasgupta et al., 1996; Ferré et al., 1991; Salim et al., 2000; Svenningsson et al., 1998), and reverses the D_2 receptor-mediated inhibition of cAMP formation (Hillion et al., 2002; Kull et al., 1999). These results have provided the anatomical and biochemical basis for the existence of a functional antagonistic interaction between A_{2A} and D_2 receptors. Accordingly, a variety of preclinical studies and clinical trials have shown that A_{2A} receptor antagonists may increase the therapeutic efficacy of L-DOPA without exacerbating L-DOPA-associated side effects, suggesting that these drugs could be used as an effective therapy combined with dopamine agonists in PD (Armentero et al., 2011; Grondin et al., 1999; Hodgson et al., 2009; Jenner, 2005, 2009; Kanda et al., 2000; Pinna et al., 2001; 2010; Rose et al., 2007; Schwarzschild et al., 2006). In addition to A_{2A} receptors, evidence has indicated that drugs antagonizing the cannabinoid CB_1 receptor might be beneficial in BG disorders, such as PD (Fernández-Ruiz, 2009, 2005). Several reports have demonstrated the localization of CB_1 and D_2 receptors in the BG (Egertová and Elphick, 2000; Mátyás et al., 2006; Pickel et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Yin and Lovinger, 2006), predominantly in the soma and dendrites of striato-pallidal GABA neurons and in corticostriatal glutamate terminals where A_{2A} receptors are also present (Carriba et al., 2007; Egertová and Elphick, 2000; Ferré et al., 2007; Pickel et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Yin and Lovinger, 2006).

Co-immunoprecipitation and co-localization assays (Hillion et al., 2002), as well as bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) techniques (Canals et al., 2003), have shown that A_{2A} - D_2 receptors can form homo- and heteromers (Franco et al., 2008; Hillion et al., 2002). Functional interactions between the CB_1 receptor and the A_{2A} or D_2 receptors, relevant for striatal function, have also been reported (Carriba et al., 2007; Marcellino et al., 2008). In particular, the existence of CB_1 - D_2 receptor heteromers in HEK-293T cell lines (Kearn et al., 2005) and of A_{2A} - CB_1 receptor heteromeric complexes in co-transfected HEK-293T cells and rat striatum has been shown (Carriba et al., 2007; Marcellino et al., 2008). CB_1 receptor signaling was found to be completely dependent on A_{2A} receptor activation in a human neuroblastoma cell line, and the motor depressant effects induced by the intrastriatal administration of a cannabinoid CB_1 receptor agonist could be fully counteracted by A_{2A} receptor antagonists in rats (Carriba et al., 2007). In addition, in rats, quinpirole-induced increase in locomotor activity can be counteracted by the CB_1 receptor agonist CP55940, at a dose that *per se* does not affect basal locomotion. Interestingly both the CB_1 receptor antagonist rimonabant and the A_{2A} receptor antagonist MSX-3, were shown to block the inhibitory effect of CB_1 receptor agonists on D_2 -like receptor agonist-induced hyperlocomotion (Marcellino et al., 2008). Overall, these results provide evidence for the existence of antagonistic CB_1 - D_2 receptor-receptor interactions within CB_1 - D_2 receptor heteromers in which A_{2A} receptors may also participate (Marcellino et al., 2008). The development of Sequential Resonance Energy Transfer (SRET) has allowed the detection of heteromultimers (Carriba et al., 2008) and the existence of trimeric complexes formed by CB_1 , D_2 , and A_{2A} receptors has been shown in co-transfected HEK-293T cells and in rodent striatum (Navarro et al., 2008, 2010).

In the present study we evaluated A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers as a potential target for the treatment of PD. The presence of A_{2A} , CB_1 and D_2 receptor heteromers was assessed *ex vivo*, in striatal membranes isolated from control rats (neurologically intact rats: NI-rats) and rats bearing a complete unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nigrostriatal lesion (hemiparkinsonian rats: HPD-rats), either treated or not with L-DOPA; identification of cross-talk within the D_2 , A_{2A} and

CB_1 receptor heteromer was achieved through radioligand binding competition assays. In addition, the effect of single and combined treatment of A_{2A} receptor antagonists – MSX-3 or SCH58261 – and a CB_1 receptor antagonist – rimonabant – on motor symptoms in HPD-rats as well as on the expression of the single receptors in striatal samples were evaluated.

Materials and methods

Animals

Male Sprague Dawley rats (Charles River, Calco, Milan, Italy) weighing 200–300 g were used in all experiments. Rats were housed in groups of 4–5 in polycarbonate cages (33w × 56l × 20h, cm), with free access to food and water and maintained under standard conditions (lights on 8.00 a.m.–8.00 p.m., 23°C). Behavioral tests were performed during the light cycle between 10.00 a.m. and 4.00 p.m.

All experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/EEC; D. L., 27.01.1992, number 116) and the guidelines for animal experimentation approved by the University of Cagliari. Efforts were made to minimize the number of animals used and to maximize humane treatment.

Drugs

6-Hydroxydopamine hydrochloride (6-OHDA), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (tacrine), desipramine hydrochloride, D-amphetamine sulfate, benserazide, CGS 21680 and dopamine were purchased from Sigma-Aldrich Srl (Milan, Italy). ZM241385, YM-09151-02 and CP55940 were purchased from Tocris (Bristol, UK). The radioligands used were: [3 H]ZM241385 (50.0 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA), [3 H]YM-09151-02 (84.4 Ci/mmol, PerkinElmer, Boston, MA, USA) or [3 H]CP55940 (144 Ci/mmol, PerkinElmer).

The adenosine A_{2A} receptor antagonist MSX-3 ((E)-phosphoric acid mono-[3-[8-[2-(3-methoxyphenyl)vinyl]-7-methyl-2,6-dioxo-1-prop-2-ynyl-1,2,6,7-tetrahydropurin-3-yl]propyl] ester disodium salt), is a water-soluble pro-drug of the active adenosine A_{2A} antagonist MSX-2, and was synthesized essentially as described (Hockemeyer et al., 2004). The adenosine A_{2A} receptor antagonist SCH58261 (5-amino-7-(2-phenylethyl)-2-(8-furyl)pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine) was provided by Prof. P.G. Baraldi (Baraldi et al., 1996). The CB_1 cannabinoid receptor antagonist rimonabant (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-di-chlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide hydrochloride) was prepared as described (Kotagiri et al., 2007).

L-DOPA, desipramine, D-amphetamine and benserazide were dissolved in distilled water and injected intraperitoneally (i.p.) in a volume of 0.3 ml/100 g body weight. Tacrine was dissolved in saline and injected i.p. in a volume of 0.1 ml/100 g body weight. MSX-3 (free acid) was re-suspended in 0.9% saline and the pH of the MSX-3 solution was adjusted by adding 1.0 M NaOH until the drug was completely dissolved following conversion to its disodium salt (pH 7.1–7.4). The saline solution, vehicle adjusted accordingly to obtain a similar pH, served as vehicle control for MSX-3. SCH58261 was suspended in 0.5% methylcellulose and injected i.p. in a volume of 1 ml/100 g body weight. The 0.5% methylcellulose solution served as the vehicle control for SCH58261. Rimonabant was freshly suspended in a vehicle consisting of few drops of tween 80 dispersed in saline and injected i.p. The tween 80/saline suspension served as the vehicle control for rimonabant.

For behavioral studies, sub-threshold doses of the A_{2A} and CB_1 receptor antagonists (2–3 mg/kg of MSX-3; 3 mg/kg of SCH58261; 1 mg/kg of rimonabant) were chosen according to previous studies (Karcz-Kubicha et al., 2003; Kelsey et al., 2009; Masserano et al., 1999; Pinna et al., 1996; Salamone et al., 2008; Simola et al., 2004) so that compounds were not effective on their own in the PD behavioral models.

Tacrine-induced jaw movements

NI-rats received an acute administration of the acetylcholinesterase inhibitor tacrine (2.5 mg/kg i.p.). This validated parkinsonian tremor model is characterized by administration of tacrine to rats which induces perioral tremor; the majority of jaw movements performed by rats occurred in bursts, therefore, the number of tremor bursts and jaw movements within each burst were scored. Tremulous jaw movements (TJMs) were defined as vertical deflections of the lower jaw not directed at a particular stimulus. Yawns, mouth gapes and tongue protrusions performed by rats were not included in the evaluation, because they were thought to reflect non-specific cholinergic peripheral effects (Salamone et al., 1998). In order to allow observation of TJMs, rats were placed into an elevated (40 cm from the bench) plexiglas cage with a metal grid over the floor. After 10 min habituation to the cage, rats were divided into groups and administered with:

- 1) MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg) + vehicle + tacrine (2.5 mg/kg); N = 5–7.
- 2) Vehicle + rimonabant (1 mg/kg) + tacrine (2.5 mg/kg); N = 7.
- 3) MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg) + rimonabant (1 mg/kg) + tacrine (2.5 mg/kg); N = 7–8.
- 4) Vehicle + vehicle + tacrine (2.5 mg/kg); N = 8–10.

MSX-3 or SCH58261 or their vehicle, and rimonabant or its vehicle, were administered 15 and 10 min, respectively, before tacrine administration. The total number of tacrine-induced bursts of TJMs and the total number of TJMs were recorded for 30 min immediately after tacrine administration.

6-OHDA lesion

Rats (275–300 g) were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.), placed on a David Kopf stereotaxic apparatus (Tujunga, CA, USA) and infused, through a stainless steel cannula, into the left medial forebrain bundle [coordinates A = -2.2, L = +1.5 from bregma, V = -7.8 from dura, according to the atlas of Pellegrino et al. (1979)] with 6-OHDA (8 µg/4 µl of saline containing 0.05% ascorbic acid). Rats were pretreated with desipramine (10 mg/kg i.p.) to prevent damage to noradrenergic neurons (Pinna et al., 1996; Ungerstedt, 1971).

Evaluation of turning behavior

Turning behavior was measured by individually placing rats in plexiglas hemispherical bowls (50 cm diameter) covered with sawdust on the bottom and connecting them to an automated rotameter system capable of detecting the number of full (360°) rotations in any direction (Panlab SLU Barcelona, Spain). Rats were placed in each apparatus 30 min before drug administration in order to acclimatize and extinguish any spontaneous turning behavior; and both contralateral and ipsilateral turns were measured every 10 min for 2 h after drug injection.

Drug treatments of unilaterally 6-OHDA lesioned rats (HPD-rats)

Two weeks after unilateral 6-OHDA-infusion, HPD-rats were primed with an injection of L-DOPA (50 mg/kg i.p.) plus benserazide (30 mg/kg i.p.); only rats displaying at least 300 contralateral turns during the 2h testing period were included in the study. Three days later, HPD-rats were randomly divided into groups and treated as follows:

- 1) MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg) + vehicle + L-DOPA (3 mg/kg) + benserazide (3 mg/kg); N = 5–7.
- 2) Vehicle + rimonabant (1 mg/kg) + L-DOPA (3 mg/kg) + benserazide (3 mg/kg); N = 5
- 3) MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg) + rimonabant (1 mg/kg i.p.) + L-DOPA (3 mg/kg) + benserazide (3 mg/kg); N = 6–11.

- 4) MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg) + rimonabant (1 mg/kg) + vehicle + vehicle; N = 5.
- 5) Vehicle + vehicle + L-DOPA (3 mg/kg) + benserazide (3 mg/kg); N = 10.

In all experiments benserazide was injected 30 min before L-DOPA. MSX-3 and rimonabant were administered 15 and 10 min, respectively, before L-DOPA; whereas SCH58261 was injected 40 min before L-DOPA (Fenu et al., 1997). The number of contralateral and ipsilateral turns were measured every 10 min for 2 h.

Behavioral data analysis

For tacrine experiments, the number of bursts and TJMs (mean ± SEM) were calculated for 30 min after tacrine administration.

For turning behavior experiments, total number of contralateral and ipsilateral turns (mean ± SEM) in 2 h testing-period were calculated.

All values are expressed as mean ± SEM. In all experiments and for all parameters, differences between groups were evaluated by Student's *t*-test followed by Newman-Keuls post hoc test. Significance was set at $p < 0.05$.

Generation and behavioral evaluation of rats used in binding studies

Striatal membranes were obtained from unilaterally 6-OHDA-lesioned rats (HPD-rats, lesioned as described above; N = 105) and neurologically intact rats (NI-rats; N = 15). Seventeen days after lesion, HPD-rats were randomly divided into two groups and received an i.p. injection of:

- 1) Amphetamine (2.5 mg/kg; N = 60)
- 2) Vehicle (N = 45).

Animals that did not perform at least 100 turns/h were discarded from further analysis. One week later, HPD-rats, that had received an amphetamine injection, were further randomly divided on two groups (Fig. 1A) and treated as follows:

- 1) HPD-rats (N = 28) received an i.p. injection of vehicle for 18 days and an acute treatment with L-DOPA (6 mg/kg) + benserazide (6 mg/kg) on the 19th day. This dose of L-DOPA is known to induce contralateral turns in HPD-animals (total contralateral turns were 370 ± 40 turns/2 h; total AIMS 6.0 ± 0.5 s/min). Evaluation of Abnormal Involuntary Movements (AIMs) is described below.
- 2) HPD-rats (N = 28) received a chronic treatment with L-DOPA (6 mg/kg) + benserazide (6 mg/kg) for 19 days. Such treatment knowingly induces the emergence of typical AIMS and sensitization of contralateral turning behavior in HPD-animals (Cenci et al., 1998; Pinna et al., 2001, 2006).

The time-dependent increase in the number of contralateral turns and AIMS was assessed in rats that received a chronic treatment, for 19 days with L-DOPA, as described in Pinna et al., 2006. According to their topographic distribution, AIMS were classified into three subtypes: 1) axial: torsion of head, neck and trunk towards the non-lesioned side; 2) limb: movements of the forelimb and the paw contralateral to the lesion, and 3) orolingual: tongue protrusion and jaw movements (Cenci et al., 1998). Contralateral turns were counted every 10 min, whereas AIMS were observed individually for 1 min every 20 min, during 2 h testing-period. Results were expressed as mean ± SEM of seconds spent by rats in total AIMS (axial, limb, orolingual) in 1 min testing-period (average of six evaluations during 2 h) and mean ± SEM of total turns after acute or chronic L-DOPA (6 mg/kg) administration during a 2 h testing-period (Pinna et al., 2006).

HPD-rats, treated chronically with 6 mg/kg L-DOPA showed a sensitization of behavioral response (turns and AIMS) during three week-treatment (total contralateral turns at the 1st day were 160 ± 40 turns/2 h; total contralateral turns at 19th day were $1300 \pm$

A Schematic protocol of treatments of rats used in binding studies

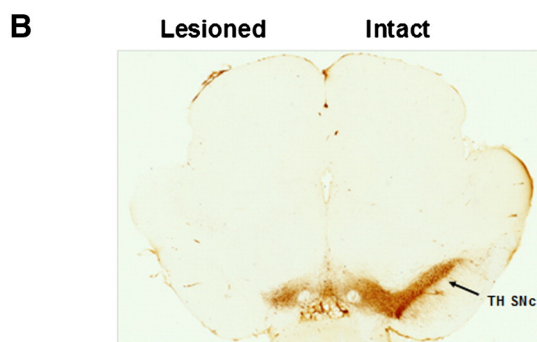
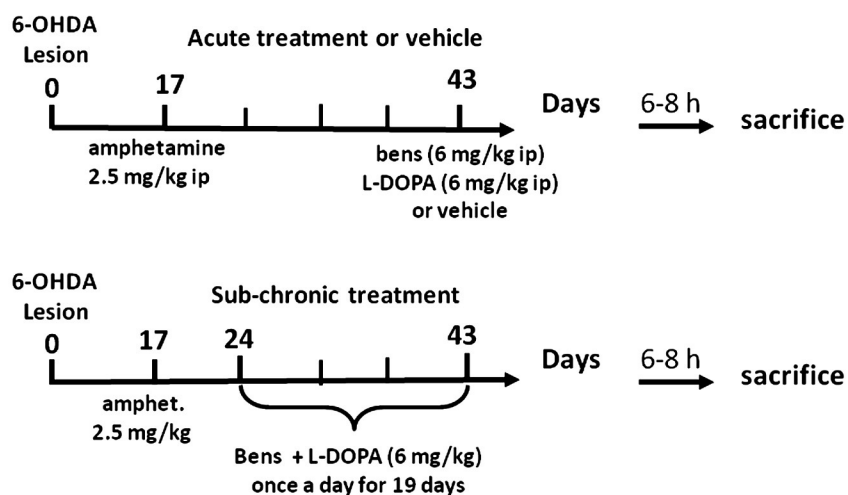


Fig. 1. A: schematic representation of the experimental procedure for binding studies. B: tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry staining. Coronal sections containing the *substantia nigra pars compacta* (SNc) were stained for the enzyme TH using a standard protocol (see Methods).

100 turns/2 h; for involuntary movements: total AIM count at 1st day was 3 ± 0.1 s/1 min; total AIM count at day 19th was 30 ± 1 / min).

To exclude any bias that might result from improper 6-OHDA lesion, the degree of neuronal cell-loss was confirmed in all animals. The correct nigrostriatal lesion was checked by immunohistochemical staining for the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) in the *substantia nigra pars compacta* (SNc; Fig. 1B). Briefly, the mesencephalic part of the brain of all unilaterally 6-OHDA-lesioned rats was post-fixed in 4% paraformaldehyde for 3 weeks. Coronal sections containing the SNc were stained for the enzyme TH (T1299, SIGMA) using a standard protocol and dopaminergic neurons were counted (Pinna et al., 2007).

All rats used for binding studies showed an almost complete lesion with less than 15% neurons surviving in the lesioned side (Fig. 1B).

Six to eight hours after the last injection of vehicle or L-DOPA (43 days after intracerebral injection of 6-OHDA or vehicle) animals, from all groups (HPD-rats that received vehicle or an acute or chronic treatment with L-DOPA, and NI-rats), were sacrificed by decapitation and brains removed rapidly. Brain areas containing the striatum (from both the lesioned and intact hemispheres) were dissected out, immediately frozen in dry ice and kept at -80°C until use for binding studies.

Radioligand binding assays

Preparation of brain striatal membranes and protein determination

Rat striatal tissue was disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 20 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for three 5 s-periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/1000). After eliminating cell debris

by centrifugation at $1000 \times g$ for 10 min, membranes were obtained by centrifugation at $105,000 \times g$ (40 mins, 4°C) and the pellet was resuspended and centrifuged again under the same conditions. Membrane pellets were stored at -80°C and were washed once more as described above and re-suspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Protein concentration was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard.

Competition assays

For competition experiments, striatal membrane suspensions (0.2 mg of protein/ml) were incubated for 2 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM MgCl_2 with the indicated radioligand concentration and increasing concentrations of the competitors (triplicates of 11–14 different concentrations) in the absence or in the presence of the indicated concentrations of the effector ligands. Non-specific binding was determined in the presence of $50 \mu\text{M}$ of the D_2 receptor antagonist YM-09151-02, $\text{A}_{2\text{A}}$ receptor agonist CGS21680 or CB_1 receptor agonist CP55940. In all cases, free and membrane-bound ligand were separated by rapid filtration of 500 μl aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% polyethylenimine that were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4). The filters were incubated with 10 ml of Ecoscint H scintillation cocktail (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) overnight at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (PerkinElmer, Boston, MA, USA) with an efficiency of 62%.

Binding data analysis

Radioligand competition curves were analyzed by nonlinear regression using the commercial Grafit curve-fitting software (Erithacus Software, Surrey, UK), by fitting the binding data to the mechanistic two-state dimer receptor model (Casadó et al., 2007, 2009). Here, we consider the possibility of a homodimer as the minimal structural unit of a receptor forming homomers or forming heteromers with another receptor. To calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants the two-state dimer model was used (Franco et al., 2006) and data from competition binding experiments were fitted using the following equation:

$$A_{\text{total bound}} = \left(\frac{K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB}}{K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B/K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B^2/(K_{DB1}K_{DB2})} \right) R_T / (K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2) + A_{\text{non-specific bound}} \quad (1)$$

where A represents free radioligand (the A_{2A} , D_2 or CB_1 receptor ligands [3H]ZM241385, [3H]YM09151-02 or [3H]CP55940, respectively) concentration, R_T is the total amount of receptor dimers and K_{DA1} and K_{DA2} are the macroscopic equilibrium dissociation constants describing the binding of the first and the second radioligand molecule (A) to the dimeric receptor; B represents the assayed competing compound (dopamine) concentration, and K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the macroscopic equilibrium dissociation constants for the binding of the first competitor molecule (B) to a dimer and for the binding of the second competitor molecule (B) to the semi-occupied dimer; K_{DAB} is the hybrid equilibrium radioligand/competitor dissociation constant, which is the dissociation constant of B binding to a receptor dimer semi-occupied by A.

Since the radioligand A ([3H]ZM241385, [3H]YM-09151-02 or [3H]CP55940) shows non-cooperative behavior, Eq. (1) can be simplified to Eq. (2) due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$ (Casadó et al., 1990, 2009); and, therefore, K_{DA1} is enough to characterize the binding of the radioligand A:

$$A_{\text{total bound}} = \left(\frac{4K_{DA1}A + 2A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB}}{4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB} + 4K_{DA1}^2B/K_{DB1} + 4K_{DA1}^2B^2/(K_{DB1}K_{DB2})} \right) R_T / (4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2) + A_{\text{non-specific bound}} \quad (2)$$

Goodness of fit was tested according to reduced χ^2 value given by the nonlinear regression program.

Results

Negative cross-talk in ligand binding to A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers from control (NI) and hemiparkinsonian (HPD) rat striatum

A characteristic of receptor heteromers is that ligand binding to one receptor can modulate ligand binding to the partner receptor in the heteromer (Ferré et al., 2009a). This biochemical cross-talk constitutes a fingerprint of the heteromer that for the A_{2A} - D_2 receptor heteromers consists of a modulation of the agonist affinity for D_2 receptors by agonist binding to A_{2A} receptors (Ferré et al., 1991, 2007). Consequently, we investigated whether any cross-talk between A_{2A} , CB_1 and D_2 receptors at the ligand binding level could be detected using striatal membranes from NI-rats or from HPD-rats. Competition experiments using 0.5 nM radiolabeled D_2 antagonist, [3H]YM-09151-02, binding vs increasing dopamine concentrations (0.01 nM to 30 μ M) were performed in the absence or the presence of 250 nM A_{2A} agonist, CGS21680, or 100 nM CB_1 agonist, CP55940, or both. In all cases the competition curves were biphasic (data not shown). From fitting the binding data to Eq. (2) the affinity constants for dopamine binding to D_2 receptor were calculated (Table 1). In samples from NI-rats or from

Table 1

Effect of A_{2A} and CB_1 receptor agonists on dopamine affinity for D_2 receptors in striatal membranes from 6-OHDA lesioned rats. Pharmacological parameters obtained from competition experiments.

| Competition experiments | Parameters | |
|--|----------------|----------------|
| [3H]YM-09151-02 vs dopamine | K_{DB1} (nM) | K_{DB2} (nM) |
| <i>Control</i> | | |
| Vehicle | 3 \pm 1 | 380 \pm 70 |
| + CGS21680 (250 nM) | 9 \pm 1** | 450 \pm 110 |
| + CP55940 (100 nM) | 8 \pm 1* | 600 \pm 100 |
| + CGS21680 + CP55940 | 5 \pm 1 | 800 \pm 200 |
| <i>6-OHDA lesioned (unlesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 4 \pm 1 | 280 \pm 90 |
| + CGS21680 (250 nM) | 9 \pm 2* | 250 \pm 30 |
| + CP55940 (100 nM) | 10 \pm 2* | 1100 \pm 400 |
| + CGS21680 + CP55940 | 3 \pm 1 | 190 \pm 90 |
| <i>6-OHDA lesioned (lesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 3 \pm 1 | 160 \pm 40 |
| + CGS21680 (250 nM) | 9 \pm 2* | 230 \pm 20 |
| + CP55940 (100 nM) | 7 \pm 1* | 200 \pm 50 |
| + CGS21680 + CP55940 | 7 \pm 1* | 220 \pm 70 |

K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and the second dopamine binding to the receptor.

* $p < 0.05$ (with respect to vehicle).

** $p < 0.01$ (with respect to vehicle).

non-lesioned hemisphere of HPD-rats, both A_{2A} and CB_1 receptor agonists, administered alone, induced a significant decrease of dopamine affinity for D_2 receptors; the effect was significant for the high-affinity (K_{D1}) but not for the low-affinity (K_{D2}) component of the binding. This effect produced by CGS21680 is consistent with the A_{2A} - D_2 receptor cross-talk reported by Salim et al., 2000, who showed that A_{2A} receptor activation by CGS21680 decreases the high affinity parameters of D_2 receptor but the low affinity ones were less affected.

Interestingly, when adenosine and cannabinoid receptor agonists were added simultaneously the binding to D_2 receptors was not altered. Results obtained using striatal samples from the lesioned hemisphere of HPD-rats showed a significant decrease in dopamine affinity in presence of A_{2A} and CB_1 receptor agonists, administered alone. Moreover, in the lesioned hemisphere of HPD-rats binding modulation was present, also, when both CGS21680 and CP 55940 were added simultaneously (Table 1). These results indicate the presence of A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers in NI and in 6-OHDA-lesioned striatum thus constituting a potential target for anti-parkinsonian therapies. However, the cross-talk observed in the lesioned side when the two agonists were added together likely reflects differential conformational changes in striatal trimers in non-lesioned versus lesioned side. To demonstrate the specificity of A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromer cross-talk found in striatum, binding assays were performed in cortex and in hippocampus. While the cross-talk could not be assayed in the cortex due to the low amount of D_2 receptors, the cross-talk was not detected in the hippocampus, which expresses measurable levels of the three receptors (data not shown).

Effect of co-administration of A_{2A} and CB_1 receptor antagonists on behavioral tests in NI- and HPD-rats

To date, compounds able to interact simultaneously with all active sites of receptors forming the A_{2A} - CB_1 - D_2 heteromer are not available, thus to evaluate the anti-parkinsonian efficacy of drugs acting on heteromers we use a combined administration of A_{2A} and CB_1 receptor antagonists.

A_{2A} receptor antagonists are in clinical trials for PD and adenosine-cannabinoid-dopamine (A_{2A} - CB_1 - D_2) receptors heteromers are present in the striatum of NI- and HPD-rats. To better clarify the putative efficacy of a combined therapeutic strategy, we assessed whether co-treatment with A_{2A} and CB_1 receptor antagonists would result in higher efficacy

compared to single treatment using two behavioral models of PD: tacrine-induced tremor and L-DOPA-induced turning. The effects of single or combined administration of the A_{2A} receptor antagonists, MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg), and the CB_1 receptor antagonist, rimonabant (1 mg/kg), on tremor bursts and TJMs induced in rat by tacrine (2.5 mg/kg) are shown in Fig. 2. Pre-treatment with MSX-3 (at either dose) or rimonabant *per se* did not produce any significant effect on tremor bursts or TJMs induced by tacrine. Likewise, co-administration of MSX-3 (at either dose) plus rimonabant did not significantly reduce total bursts or TJMs (Fig. 2A/B). SCH58261, when administered alone, produced a significant decrease in both parameters (Fig. 2C). When the

A_{2A} and CB_1 antagonist were co-administered rimonabant reverted the effect of SCH58261 on TJMs but not on bursts (Fig. 2C).

The effects of single or combined administration of the A_{2A} antagonists, MSX-3 (2 or 3 mg/kg) or SCH58261 (3 mg/kg), and the CB_1 antagonist rimonabant (1 mg/kg) on the potentiation of contralateral and ipsilateral turning behavior induced by a low dose of L-DOPA (3 mg/kg) are shown in Fig. 3. Controls, performed in the absence of L-DOPA, showed that MSX-3 or rimonabant induced a slight non-significant increase of both contralateral and ipsilateral turns, indicative of a motor stimulating effect but not of an anti-parkinsonian effect. Similarly, combined administration of MSX-3 (2 or 3 mg/kg) and rimonabant, in the absence of

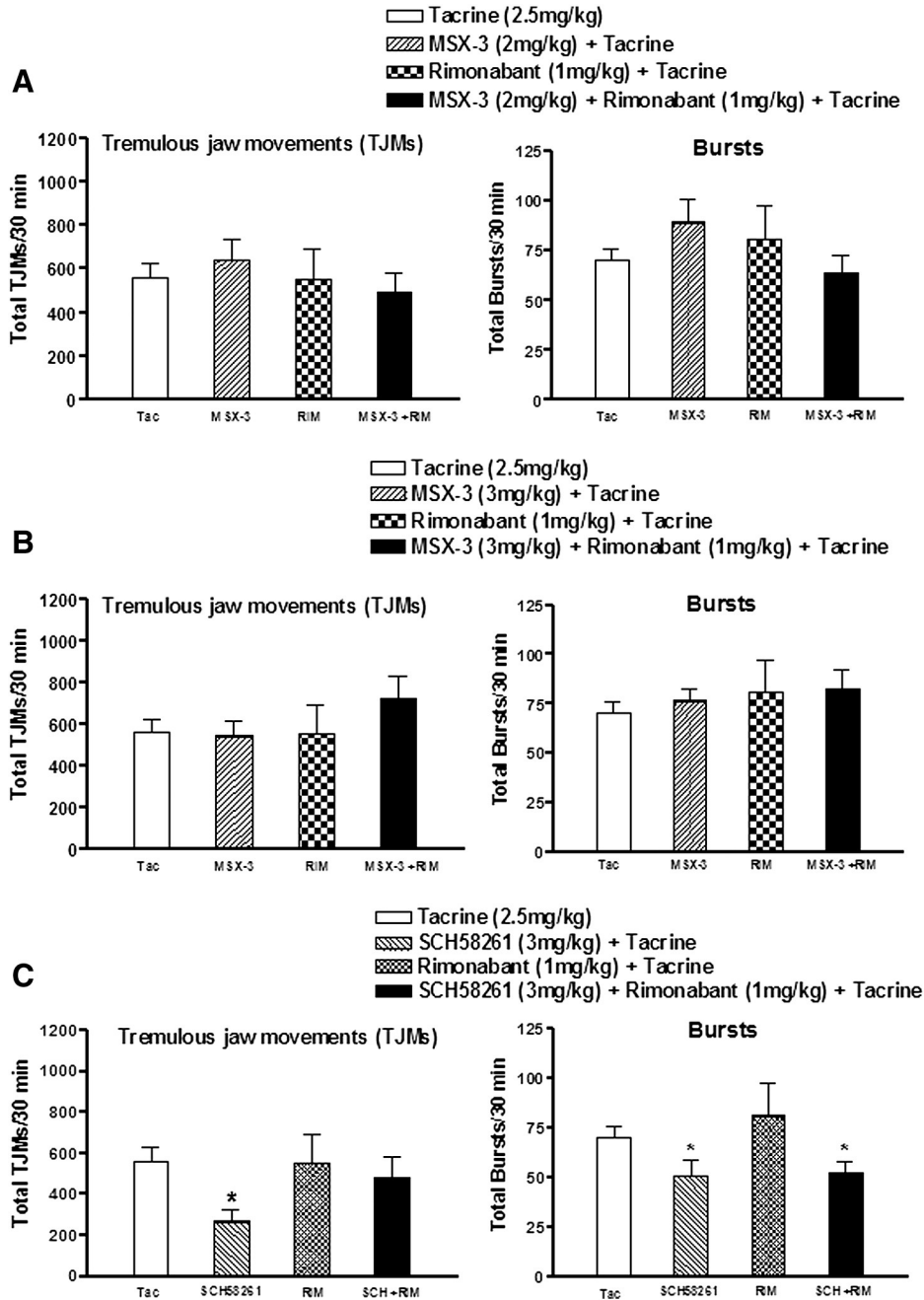


Fig. 2. Effect of the administration of the A_{2A} receptor antagonists, MSX-3 (2 or 3 mg/kg i.p.) (A and B) or SCH58261 (3 mg/kg i.p.) (C), and the CB_1 receptor antagonist, rimonabant, (1 mg/kg i.p.), alone or in combination, on tremor bursts and tremulous jaw movements (TJMs) induced by tacrine (2.5 mg/kg i.p.). Results are mean \pm SEM of tremor bursts and jaw movements, recorded for 30 min after tacrine administration. Statistical significance was determined by Student's *t*-test followed by Newman-Keuls post hoc test. **p* < 0.05 as compared to vehicle-pretreated rats.

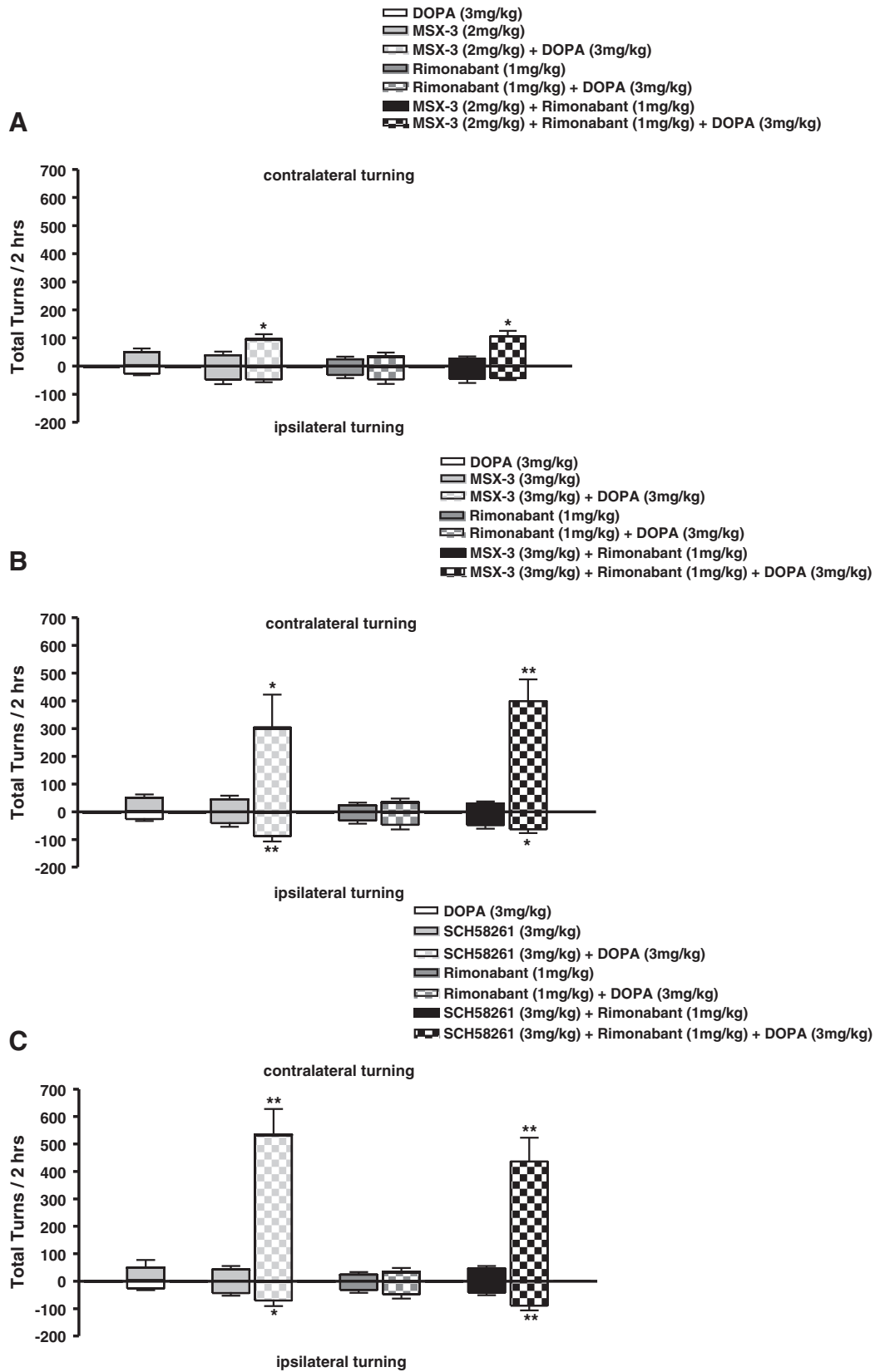


Fig. 3. Effect of the administration of A_{2A} receptor antagonists, MSX-3 (2 or 3 mg/kg i.p.) (A and B) or SCH58261 (3 mg/kg i.p.) (C), and CB_1 receptor antagonist, rimonabant, (1 mg/kg i.p.), alone or in combination, on turning behavior induced by a sub-threshold dose of L-DOPA (3 mg/kg i.p.). Ordinate indicates the total number of turns measured in 2 h; positive and negative values represent contralateral and ipsilateral turns, respectively. Results are mean \pm SEM of total turns. Statistical significance was determined by Student *t*-test followed by Newman–Keuls post hoc test. **p* < 0.05, ***p* < 0.005, versus L-DOPA alone.

L-DOPA, did not induce any turns but only hyper-motility. Rimonabant given in the presence of L-DOPA (3 mg/kg), induced a slight non-significant increase of contralateral and ipsilateral turns compared to that induced by L-DOPA alone, similarly indicative of hyper-motility but not of anti-parkinsonian effect. In contrast, MSX-3 (2 or 3 mg/kg) in combination with L-DOPA (3 mg/kg) induced a significant, dose-dependent increase in contralateral turns with respect to L-DOPA alone (Fig. 3A/B). The combined administration of the two antagonists (rimonabant plus MSX-3) led to a potentiation of turning behavior induced by L-DOPA that was similar to that induced by MSX-3 alone (Fig. 3A/B). The use of SCH58261 as A_{2A} receptor antagonist led to a similar but more marked increase in turning behavior, and combined administration of 3 mg/kg SCH58261 and 1 mg/kg rimonabant induced a significant potentiation of L-DOPA-induced contralateral turns, that was similar to that induced by SCH58261 alone (**p < 0.005 versus L-DOPA alone; Fig. 3C). In the absence of L-DOPA, administration of SCH58261 alone or in combination with rimonabant induced a slight increase of contralateral and ipsilateral turns, indicative once more of motor stimulating but not anti-parkinsonian action (Fig. 3C). These results indicate that the anti-parkinsonian effect achieved by A_{2A} receptor antagonists and low doses of L-DOPA cannot be potentiated by CB₁ receptor antagonism.

L-DOPA treatment leads to the loss of cross-talk between receptors in the A_{2A}-CB₁-D₂ receptor heteromer

To try to understand why the combined pharmacological treatment did not exert any additional effects in the rat model of PD, competition experiments were performed to detect heteromer expression in HPD-rats acutely treated with L-DOPA. The affinity constants for dopamine binding to D₂ receptors obtained from competition experiments of 0.5 nM radiolabeled D₂ antagonist [³H]YM-09151-02 binding vs increasing dopamine concentrations (0.01 nM to 30 μM) in the absence or the presence of 250 nM CGS21680 or 100 nM CP55940, or both, are shown in Table 2. In HPD-rats acutely treated with L-DOPA, the decrease of dopamine affinity for D₂ receptors induced by A_{2A} or CB₁ agonists, alone or in combination, was not significant in striatal membranes obtained from either hemisphere, lesioned or intact, (Table 2). Similar

results were obtained in lesioned and non-lesioned striata of HPD-rats chronically treated with L-DOPA that showed sensitized AIMs and contralateral turning behavior (Table 2). These results indicate that L-DOPA treatment leads to the loss of cross-talk between receptors. Abolishment of the intermolecular cross-talk likely reflects functional or structural disruption of the heteromer. It is important to point out that changes in receptor heteromer cross-talk in L-DOPA-treated rats were not due to changes in the relative expression levels of the receptors (Fig. 4). A decrease in receptor expression would account for a loss of heteromers and, consequently, a reduction of cross-talk on binding assays. On the other hand, the D₂ and CB₁ receptor levels were significantly increased in the lesioned versus non-lesioned striatum in both HPD-rats treated with vehicle and HPD-rats acutely and chronically treated with L-DOPA. The receptor levels in the non-lesioned hemisphere were similar to those in NI animals. The level of A_{2A} receptors in both hemispheres was slightly diminished respect to that found in NI animal striatum, although not reaching statistical significance.

Discussion

The search for new therapeutic strategies to counteract PD symptoms and/or reduce dyskinesias induced by chronic treatment with L-DOPA is influenced by the emergence of the “receptor heteromer” concept. Receptor heteromers constitute an entity with functional properties different

Table 2
Effect of A_{2A} and CB₁ receptor agonists on dopamine affinity for D₂ receptors in striatal membranes from 6-OHDA lesioned rats treated with L-DOPA. Pharmacological parameters obtained from competition experiments.

| Competition experiments | Parameters | |
|--|-----------------------|-----------------------|
| [³ H]YM-09151-02 vs dopamine | K _{DB1} (nM) | K _{DB2} (nM) |
| <i>Acute L-DOPA (unlesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 2.5 ± 0.3 | 200 ± 100 |
| + CGS21680 (250 nM) | 4.5 ± 0.3 | 240 ± 70 |
| + CP55940 (100 nM) | 3.4 ± 0.5 | 130 ± 40 |
| + CGS21680 + CP55940 | 1.7 ± 0.6 | 120 ± 30 |
| <i>Acute L-DOPA (lesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 1.5 ± 0.2 | 140 ± 40 |
| + CGS21680 (250 nM) | 1.9 ± 0.3 | 170 ± 50 |
| + CP55940 (100 nM) | 2.2 ± 0.5 | 190 ± 50 |
| + CGS21680 + CP55940 | 3 ± 2 | 270 ± 70 |
| <i>Chronic L-DOPA (unlesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 4.3 ± 0.3 | 250 ± 50 |
| + CGS21680 (250 nM) | 5 ± 1 | 300 ± 40 |
| + CP55940 (100 nM) | 5 ± 1 | 280 ± 30 |
| + CGS21680 + CP55940 | 5 ± 1 | 170 ± 90 |
| <i>Chronic L-DOPA (lesioned side)</i> | | |
| Vehicle | 3.1 ± 0.6 | 240 ± 60 |
| + CGS21680 (250 nM) | 3.3 ± 0.7 | 400 ± 90 |
| + CP55940 (100 nM) | 8 ± 2 | 800 ± 20** |
| + CGS21680 + CP55940 | 5 ± 1 | 200 ± 40 |

K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and the second dopamine binding to the receptor.
** p < 0.01 (with respect to vehicle).

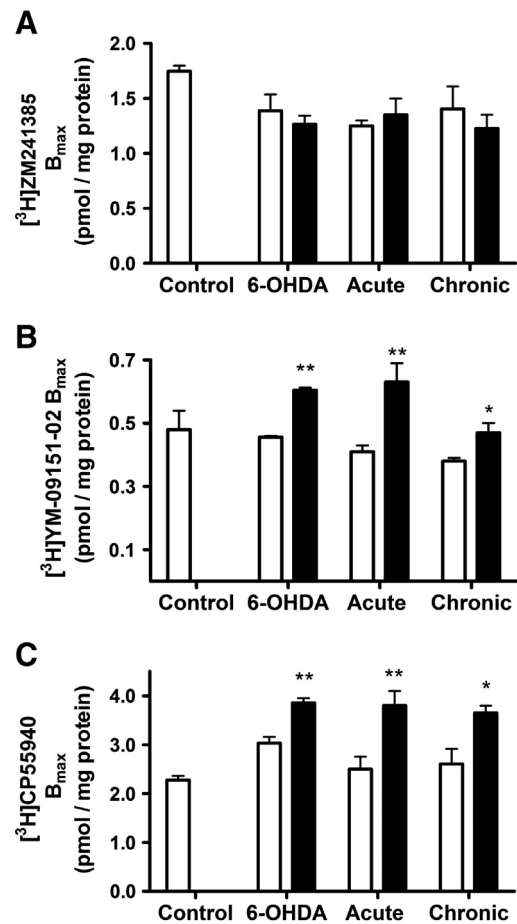


Fig. 4. A_{2A}, CB₁ and D₂ receptor expression using membranes (0.2 mg protein/ml) of non-lesioned (white) or lesioned (black) hemi-striata. Maximum binding was calculated from competition experiments of A_{2A} receptor antagonist [³H]ZM241385 (4 nM, A), D₂ antagonist [³H]YM-09151-02 (0.5 nM, B) or CB₁ agonist [³H]CP55940 (6 nM, C) binding. Unspecific binding was assessed using 50 μM of the non-radiolabeled ligands, and B_{max} values were calculated using the parameters considering the following affinity constants (K_{DA1}): 1 nM for ZM241385, 0.12 nM for YM-09151-02 and 4 nM for CP55940. Values are mean ± SEM of triplicates. Statistical significance was determined by ANOVA followed by Dunnett’s multiple comparison post-hoc test. *p < 0.05, **p < 0.01 lesioned vs non-lesioned hemisphere.

from those of each individual receptor involved (Ferré et al., 2009a, 2009b). Biochemical and biophysical technologies have led to the clear identification of A_{2A} , CB_1 and D_2 receptor heteromers (Carriba et al., 2008; Héroux et al., 2007; Hillion et al., 2002; Navarro et al., 2008, 2010), and studies *in vitro* have shown that these heteromers are selectively coupled to the mitogen-activated protein kinase pathway (Higley and Sabatini, 2010; Marcellino et al., 2008; Navarro et al., 2010). In addition, the use of mutants that alter the quaternary structure of the complex, has demonstrated that activation of A_{2A} or CB_1 receptors in the heteromer negatively modulates D_2 receptor function (Navarro et al., 2010). In fact, this cannabinoid-adenosine-dopamine receptor cross-talk, which depends on a correct trimer structure, is considered to be a fingerprint of the heteromer. The antagonistic interactions between striatal CB_1 , D_2 and A_{2A} receptors have been further highlighted at the behavioral level in NI-rats (Marcellino et al., 2008). From these considerations, we hypothesized that striatal A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers could be a therapeutic target for the symptomatic treatment of PD.

In this study, the radioligand binding data indicate that the biochemical fingerprint of striatal D_2 -receptor-containing heteromers is found in NI-rats as well as in both intact and lesioned hemispheres of HPD-rats. These results demonstrate that A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers are present in the brain not only under physiological conditions but also in neuro-pathological conditions, in particular in the lesioned striatum of rats bearing a toxin-induced unilateral dopaminergic nigrostriatal degeneration. These observations indicate that selective targeting of A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers may constitute an alternative therapeutic strategy for PD and that receptors in these multimeric complexes are being targeted by current dopamine- as well as non-dopaminergic-based anti-parkinsonian therapies.

Positive effects of CB_1 antagonism as well as A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor cross-talk have been observed in NI-animals strongly indicating the presence of receptor heteromers in the intact nigrostriatal pathway (Marcellino et al., 2008). Progression of the nigral pathology and the appearance of major parkinsonian symptoms seem to be associated with over-activity of the cannabinoid signaling system, such as increased CB_1 receptor density and function, and elevated endocannabinoid levels in many BG nuclei in animal models of PD (Di Marzo et al., 2000; Fernandez-Espejo et al., 2004; Fernández-Ruiz, 2009; Gubellini et al., 2002; Lastres-Becker et al., 2001; Romero et al., 2000; van der Stelt et al., 2005), as well as in PD patients (Lastres-Becker et al., 2001; Pisani et al., 2005). The CB_1 receptor antagonist rimonabant has been shown to increase motor activity as well as a variety of movements, but showed no effect on bradykinesia or posture in a non-human primate model of PD (van der Stelt et al., 2005). Blockade of CB_1 receptors might thus only be effective on particular aspects of PD motor deficits and at a particular time along the neurodegeneration process (Fernandez-Espejo et al., 2005; García-Arencibia et al., 2008; Gonzalez et al., 2006). Systemic as well as local central injections of rimonabant may reduce a variety of behavioral PD symptoms in HPD-rats and increase locomotor activity in rats with bilateral intracerebroventricular 6-OHDA-induced lesions (El-Banoua et al., 2004; Fernandez-Espejo et al., 2005; Gonzalez et al., 2006). Rimonabant could also effectively improve and potentiate L -DOPA effects on contralateral adjusting step impairment in HPD-rats suggesting that CB_1 antagonism may be effective as monotherapy in early PD patients (Kelsey et al., 2009). Interestingly, motor depression induced by the bilateral striatal infusion of a CB_1 agonist in rats was completely counteracted by systemic administration of CB_1 as well as A_{2A} antagonists (Carriba et al., 2007). Existing data thus seem to suggest that CB_1 antagonists have potential anti-parkinsonian activity that may be hidden/modified in the presence of A_{2A} antagonists.

We used two behavioral models of PD, tacrine-induced tremor and L -DOPA-induced turning, to further determine the therapeutic efficacy of multidrug treatment, using compounds that act on the receptors forming A_{2A} - CB_1 - D_2 heteromers. Tacrine-induced TJMs show many of the characteristics of parkinsonian tremor in humans and may be attenuated by anti-parkinsonian drugs, including L -DOPA and dopamine

receptor agonists such as apomorphine, bromocriptine, pergolide, or ropinirole (Ishiwari et al., 2005). Our data show that the two A_{2A} receptor antagonists used in this study have different therapeutic profiles against tacrine-induced tremor. SCH58261 showed a significant anti-tremorigenic effect, in accordance with previous observations (Collins et al., 2010; Hauser et al., 2008; Salamone et al., 2008; Simola et al., 2004, 2006), while MSX-3 had no effect. Similarly, the combined A_{2A} - CB_1 antagonist (SCH58261-rimonabant) administration effectively reduced only tremor bursts. These differences between the two A_{2A} receptor antagonists may be due to the low doses purposively chosen for this study to assess possible potentiation effects of combined treatment with the CB_1 receptor antagonist. In addition, the two compounds belong to two different chemical classes of A_{2A} receptor antagonists (Armentero et al., 2011; Müller and Ferré, 2007; Müller and Jacobson, 2011), and possess different pharmacokinetic properties that may contribute to the distinct *in vivo* efficacy observed here. Similar differences have also been observed for MSX-3 and SCH58261 in other tremor models and could depend on distinct selective efficacy on dopaminergic or cholinergic transmission (Collins et al., 2010; Salamone et al., 2008; Simola et al., 2004, 2006). While it is recognized that A_{2A} , D_2 and CB_1 receptors are expressed on striatal cholinergic receptors (Fusco et al., 2004; Tozzi et al., 2011), heteromer formation in these interneurons has not been addressed yet. Interestingly, recent data have pointed out that the potential of the A_{2A} receptor to form heteromers with other G-protein-coupled receptors, including CB_1 and D_2 receptors, may vary depending on the cellular and/or subcellular location (Orrú et al., 2011a, 2011b). As tacrine-induced tremor could not be attenuated by combined treatment with adenosine and cannabinoid antagonists, the presence of multimeric A_{2A} - CB_1 - D_2 receptors or functional cannabinoid/adenosine interactions do not seem relevant for cholinergic transmission.

Turning behavior contralateral to the 6-OHDA-lesioned side of the brain is typically induced by treatments improving motor deficits or increasing L -DOPA efficacy. In our study we used doses of the A_{2A} and CB_1 antagonists, which *per se* did not prompt any contralateral turning behavior, to evaluate a putative increased effect of combined treatment with these receptor antagonists. A_{2A} antagonists, MSX-3 or SCH58261, enhanced the turning behavior induced by L -DOPA in HPD-rats, consistent with previous studies using L -DOPA, or D_1 or D_2 receptor agonists (Fenu et al., 1997; Hodgson et al., 2009; Koga et al., 2000; Pinna et al., 1996, 2001, 2010; Rose et al., 2007; Tronci et al., 2007). Conversely, the CB_1 receptor antagonist, rimonabant did not potentiate L -DOPA-induced turning. The combined co-administration of either A_{2A} receptor antagonist with rimonabant, produced a significant potentiation of contralateral turning induced by L -DOPA alone; this enhancement, however, was not significantly different from that induced by administration of the A_{2A} receptor antagonists alone. This finding suggests that, following administration of L -DOPA, blockade of CB_1 receptors in the presence of adenosine A_{2A} receptor antagonists does not cause any additional anti-parkinsonian efficacy in HPD-rats. Overall, the lack of additional anti-parkinsonian efficacy of CB_1 antagonist when A_{2A} receptors are blocked may be due to the loss of A_{2A} - CB_1 - D_2 receptor heteromers in presence of L -DOPA, and/or to a complex functional and/or pharmacological interaction between A_{2A} and CB_1 receptors not necessarily engaged in multimeric complexes. Indeed, there is compelling evidence of a complex interaction of A_{2A} and CB_1 receptors in the striatum (for a review see Ferré et al., 2010); these receptors may be located at dendritic spines of striato-pallidal GABA neurons and/or at glutamatergic terminals making a synaptic contacts with striato-nigral GABA neurons (Carriba et al., 2007; Egertová and Elphick, 2000; Ferré et al., 2007; Pickel et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Yin and Lovinger, 2006). The latter is involved in motor-depressant and rewarding effects of the partial CB_1 receptor agonism as deduced from behavioral and microdialysis experiments using tetrahydrocannabinol (Ferré et al., 2010; Justinová et al., 2011). Biochemical and electrophysiological findings also suggested that post-synaptic mechanisms are involved in striatal A_{2A} receptor-dependent regulation

of cataleptogenic effects of cannabinoids acting on CB₁ receptors (Andersson et al., 2005; Tebano et al., 2009). In both cases, a basal level of A_{2A} receptor activation is necessary for CB₁ receptor function (Ferré et al., 2010).

Although A_{2A} receptor antagonists may produce similar behavioral effects to CB₁ receptor antagonists (Andersson et al., 2005; Carriba et al., 2007; Justinová et al., 2011; Soria et al., 2004), a report by Lerner et al. (2010) shows that pharmacological blockade of CB₁ receptors reduces the locomotor activation induced by an A_{2A} antagonist in mice habituated to the testing environment (Lerner et al., 2010). Interestingly, in non-habituated mice cannabinoid receptor antagonists depress locomotion not only in A_{2A}-receptor-antagonist-treated but also in vehicle-treated animals (Orrù et al., 2011a). In striatal glutamatergic terminals the CB₁-mediated inhibition of glutamate release due to A_{2A} activation may also result from an interaction at the second messenger level (Ferré et al., 2010; Justinová et al., 2011; Martire et al., 2011). All these results suggest complex relationships between CB₁ and A_{2A} receptors in what concerns locomotion, not only in lesioned animals but also in NI animals subjected to qualitatively different challenges.

Data in the present report show in HPD-rats the lack of additive anti-parkinsonian activity of the combined administration of A_{2A} and CB₁ receptor antagonists. It should be noted that, Orrù et al. (2011b) have shown that A_{2A} receptor antagonists, previously considered to be pharmacologically similar, may display in striatum preferential pre- or post-synaptic profiles. Istradefylline, for instance, seems the compound with the best post-synaptic profile thus interacting with A_{2A} receptors forming heteromers with D₂ receptors (Orrù et al., 2011b). In contrast, MSX-3 and SCH58261, which were used in the present study, have a mixed pre- and post-synaptic profile (Orrù et al., 2011b). Therefore, further studies using different A_{2A} antagonists and more sophisticated techniques are needed to clarify the behavioral influence of the combined administration of A_{2A} and CB₁ antagonists in physiological and neuro-pathological conditions.

Taken together our binding data indicate that A_{2A}-CB₁-D₂ receptor heteromers are present in the striatum of NI- and HPD-rats, and that the cross-talk is lost with acute or chronic L-DOPA treatment. The behavioral data in HPD-rats go in the same direction, and indicate that the combined administration of A_{2A} and CB₁ antagonists, in the presence of L-DOPA, does not produce a different response from administration of the A_{2A} receptor antagonist alone. L-DOPA treatment may disrupt the receptor cross-talk due to conformational changes in the quaternary structure of the heteromer. This report shows that a current therapy may modify the expression of heteromers in the central nervous system.

Acknowledgments

We thank Jasmina Jiménez (Molecular Neurobiology laboratory, Barcelona University) for her technical assistance. This study was supported by grants from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2012-39875-C01-01, SAF2010-18472, and SAF2008-03118-E, within the framework of the Era-NET Neuron program), a grant (RC2008MinSal/Era-NET) from the Italian Ministry of Health in the frame of the Era-NET NEURON program and a grant for collaborative projects (PI2011/02-7) from the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). PJM is a Ramón y Cajal Fellow. Y.B. and C.E.M. were funded by the BMBF, Germany (01EW0911) in the frame of Era-NET NEURON program. Dr. Nicola Simola gratefully acknowledges Sardinia Regional Government for the financial support (P.O.R. Sardegna F.S.E. Operational Programme of the Autonomous Region of Sardinia, European Social Fund 2007–2013 – Axis IV Human Resources, Objective 1.3, Line of Activity 1.3.1 “Avviso di chiamata per il finanziamento di Assegni di Ricerca”).

References

- Andersson, M., Usiello, A., Borgkvist, A., Pozzi, L., Dominguez, C., Fienberg, A.A., Svenningsson, P., et al., 2005. Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J. Neurosci.* 25, 8432–8438.
- Armentero, M.T., Pinna, A., Ferré, S., Lanciego, J.L., Müller, C.E., Franco, R., 2011. Past, present and future of A(2A) adenosine receptor antagonists in the therapy of Parkinson's disease. *Pharmacol. Ther.* 132, 280–299.
- Baraldi, P.G., Cacciari, B., Spalluto, G., Pineda de las Infantas y Villatoro, M.J., Zocchi, C., Dionisotti, S., et al., 1996. Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives: potent and selective A(2A) adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* 39, 1164–1171.
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S.R., et al., 2003. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 278, 46741–46749.
- 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.
- Carriba, P., Navarro, G., Ciruela, F., Ferré, S., Casadó, V., Agnati, L., et al., 2008. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* 5, 727–733.
- Casadó, V., Cantí, C., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., Franco, R., 1990. Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* 26, 461–473.
- Casadó, V., Cortés, A., Ciruela, F., Mallol, J., Ferré, S., Lluís, C., et al., 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.
- Casadó, V., Ferrada, C., Bonaventura, J., Gracia, E., Mallol, J., Canela, E.I., et al., 2009. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem. Pharmacol.* 78, 1456–1463.
- Cenci, M.A., Lee, C.S., Bjorklund, A., 1998. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2694–2706.
- Collins, L.E., Galtieri, D.J., Brennum, L.T., Sager, T.N., Hockemeyer, J., Müller, C.E., et al., 2010. Oral tremor induced by the muscarinic agonist pilocarpine is suppressed by the adenosine A2A antagonists MSX-3 and SCH58261, but not the adenosine A1 antagonist DPCPX. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 561–569.
- Dasgupta, S., Ferré, S., Kull, B., Hedlund, P.B., Finnman, U.B., Ahlberg, S., et al., 1996. Adenosine A2A receptors modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *Eur. J. Pharmacol.* 316, 325–331.
- Di Marzo, V., Hill, M.P., Bisogno, T., Crossman, A.R., 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.* 14, 1432–1438.
- Egertová, M., Elphick, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB₁. *J. Comp. Neurol.* 422, 159–171.
- El-Banoua, F., Caraballo, I., Flores, J.A., Galan-Rodriguez, B., Fernandez-Espejo, E., 2004. Effects on turning of microinjections into basal ganglia of D(1) and D(2) dopamine receptors agonists and the cannabinoid CB(1) antagonist SR141716A in a rat Parkinson's model. *Neurobiol. Dis.* 16, 377–385.
- Fenu, S., Pinna, A., Ongini, E., Morelli, M., 1997. Adenosine A2A receptor antagonism potentiates L-DOPA-induced turning behavior and c-fos expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur. J. Pharmacol.* 321, 143–147.
- Fernandez-Espejo, E., Caraballo, I., Rodriguez de Fonseca, F., Ferrer, B., El Banoua, F., Flores, J.A., et al., 2004. Experimental parkinsonism alters anandamide precursor synthesis, and functional deficits are improved by AM404: a modulator of endocannabinoid function. *Neuropsychopharmacology* 29, 1134–1142.
- Fernandez-Espejo, E., Caraballo, I., de Fonseca, F.R., El Banoua, F., Ferrer, B., Flores, J.A., et al., 2005. Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* 18, 591–601.
- Fernández-Ruiz, J., 2009. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 156, 1029–1040.
- Fernández-Ruiz, J., González, S., 2005. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb. Exp. Pharmacol.* 168, 479–507.
- Ferré, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B.B., Fuxe, K., 1991. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7238–7241.
- Ferré, S., Agnati, L.F., Ciruela, F., Lluís, C., Woods, A.S., Fuxe, K., et al., 2007. Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in 'local modules': the striatal spine module. *Brain Res. Rev.* 55, 55–67.
- Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., et al., 2009a. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* 5, 131–134.
- Ferré, S., Goldberg, S.R., Lluís, C., Franco, R., 2009b. Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function. *Neuropharmacology* 56 (Suppl. 1), 226–234.
- Ferré, S., Lluís, C., Justinova, Z., Quiroz, C., Orru, M., Navarro, G., Canela, E.I., Franco, R., Goldberg, S.R., 2010. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br. J. Pharmacol.* 160, 443–453.
- Franco, R., Casadó, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferré, S., Fuxe, K., et al., 2006. The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol. Pharmacol.* 69, 1905–1912.

- Franco, R., Casadó, V., Cortés, A., Pérez-Capote, K., Mallol, J., Canela, E., et al., 2008. Novel pharmacological targets based on receptor heteromers. *Brain Res. Rev.* 58, 475–482.
- Fusco, F.R., Martorana, A., Giampà, C., De March, Z., Farini, D., D'Angelo, V., et al., 2004. Immunolocalization of CB1 receptor in rat striatal neurons: a confocal microscopy study. *Synapse* 53, 159–167.
- García-Arencibia, M., Ferraro, L., Tanganelli, S., Fernández-Ruiz, J., 2008. Enhanced striatal glutamate release after the administration of rimonabant to 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci. Lett.* 438, 10–13.
- Gonzalez, S., Scorticati, C., Garcia-Arencibia, M., de Miguel, R., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J., 2006. Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1073–1074, 209–219.
- Grondin, R., Bédard, P.J., Hadj Tahar, A., Grégoire, L., Mori, A., Kase, H., 1999. Antiparkinsonian effect of a new selective adenosine A2A receptor antagonist in MPTP-treated monkeys. *Neurology* 52, 1673–1677.
- Gubellini, P., Picconi, B., Bari, M., Battista, N., Calabresi, P., Centonze, D., et al., 2002. Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* 22, 6900–6907.
- Hauser, R.A., Shulman, L.M., Trugman, J.M., Roberts, J.W., Mori, A., Ballerini, R., et al., 2008. Istradefylline 6002-US-013 Study Group. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. *Mov. Disord.* 23, 2177–2185.
- Héroux, M., Hogue, M., Lemieux, S., Bouvier, M., 2007. Functional calcitonin gene-related peptide receptors are formed by the asymmetric assembly of a calcitonin receptor-like receptor homo-oligomer and a monomer of receptor activity-modifying protein-1. *J. Biol. Chem.* 282, 31610–31620.
- Higley, M.J., Sabatini, B.L., 2010. Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat. Neurosci.* 13, 958–966.
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., et al., 2002. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 18091–18097.
- Hockmeyer, J., Burbiel, J.C., Muller, C.E., 2004. Multigram-scale syntheses, stability, and photoreactions of A_{2A} adenosine receptor antagonists with 8-styrylxanthine structure: potential drugs for Parkinson's disease. *J. Org. Chem.* 69, 3308–3318.
- Hodgson, R.A., Bertorelli, R., Varty, G.B., Lachowicz, J.E., Forlani, A., Fredduzzi, S., et al., 2009. Characterization of the potent and highly selective A2A receptor antagonists preladanet and Sch 412348 [7-[2-[4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-2-(2-furanyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazol-1,5c] pyrimidin-5-amine] in rodent models of movement disorders and depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 294–303.
- Ishiwari, K., Betz, A., Weber, S., Felsted, J., Salamone, J.D., 2005. Validation of the tremulous jaw movement model for assessment of the motor effects of typical and atypical antipsychotics: effects of pimozide (Orap) in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 351–362.
- Jenner, P., 2005. Istradefylline, a novel adenosine A2A receptor antagonist, for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 14, 729–738.
- Jenner, P., Mori, A., Hauser, R., Morelli, M., Fredholm, B.B., Chen, J.F., 2009. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, 406–413.
- Justinová, Z., Ferré, S., Redhi, G.H., Mascia, P., Stroik, J., Quarta, D., Yasar, S., Müller, C.E., Franco, R., Goldberg, S.R., 2011. Reinforcing and neurochemical effects of cannabinoid CB1 receptor agonists, but not cocaine, are altered by an adenosine A2A receptor antagonist. *Addict. Biol.* 16, 405–415.
- Kanda, T., Jackson, M.J., Smith, L.A., Pearce, R.K., Nakamura, J., Kase, H., et al., 2000. Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Exp. Neurol.* 162, 321–327.
- Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, Z., et al., 2003. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 28, 1281–1291.
- Kearn, C.S., Blake-Palmer, K., Daniel, E., Mackie, K., 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.
- Kelsey, J.E., Harris, O., Cassin, J., 2009. The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as mono-therapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 203, 304–307.
- Koga, K., Kurokawa, M., Ochi, M., Nakamura, J., Kuwana, Y., 2000. Adenosine A(2A) receptor antagonists KF17837 and KW-6002 potentiate rotation induced by dopaminergic drugs in hemi-parkinsonian rats. *Eur. J. Pharmacol.* 408, 249–255.
- Kotagiri, V.K., Suthrapu, S., Reddy, R., C.P., Bollugoddu, V., Bhattacharya, A., et al., 2007. An improved synthesis of rimonabant: anti-obesity drug. *Org. Process Res. Dev.* 11, 910–912.
- Kull, B., Ferré, S., Arslan, G., Svenningsson, P., Fuxe, K., Owman, C., et al., 1999. Reciprocal interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors in Chinese hamster ovary cells co-transfected with the two receptors. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1035–1045.
- Lastres-Becker, I., Cebeira, M., de Ceballos, M.L., Zeng, B.Y., Jenner, P., Ramos, J.A., et al., 2001. Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur. J. Neurosci.* 14, 1827–1832.
- Lerner, T.N., Horne, E.A., Stella, N., Kreitzer, A.C., 2010. Endocannabinoid signaling mediates psychomotor activation by adenosine A2A antagonists. *J. Neurosci.* 30, 2160–2164.
- Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., et al., 2008. Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 54, 815–823.
- Marsden, C.D., 1994. Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 672–681.
- Martire, A., Tebano, M.T., Chiodi, V., Ferreira, S.G., Cunha, R.A., Köfalvi, A., Popoli, P., 2011. Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *J. Neurochem.* 116, 273–280.
- Masserano, J.M., Karoum, F., Wyatt, R.J., 1999. SR 141716A, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, potentiates the locomotor stimulant effects of amphetamine and apomorphine. *Behav. Pharmacol.* 10, 429–432.
- Mátyás, F., Yanovsky, Y., Mackie, K., Kelsch, W., Misgeld, U., Freund, T.F., 2006. Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 137, 337–361.
- Müller, C.E., Ferré, S., 2007. Blocking striatal adenosine A_{2A} receptors: a new strategy for basal ganglia disorders. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* 2, 1–21.
- Müller, C.E., Jacobson, K.A., 2011. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1290–1308.
- Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., et al., 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. *Sci. World J.* 8, 1088–1097.
- Navarro, G., Ferré, S., Cordomi, A., Moreno, E., Mallol, J., Casadó, 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.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Macias, R., Alvarez, L., Guridi, J., et al., 2000. Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. *Neurology* 55 (12 Suppl. 6), S7–S12.
- Olanow, C.W., 2004. The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Med.* 55, 41–60.
- Orrú, M., Quiroz, C., Guitart, X., Ferré, S., 2011a. Pharmacological evidence for different populations of postsynaptic adenosine A2A receptors in the rat striatum. *Neuropharmacology* 61, 967–974.
- Orrú, M., Bakošová, J., Brugarolas, M., Quiroz, C., Beaumont, V., Goldberg, S.R., et al., 2011b. Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists. *PLoS One* 6, e16088.
- Pellegrino, L.J., Pellegrino, A.S., Cushman, A.J., 1979. A stereotaxic atlas of the rat brain. Plenum Press, New York, NY.
- Pickel, V.M., Chan, J., Kearn, C.S., Mackie, K., 2006. Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.* 495, 299–313.
- Pinna, A., di Chiara, G., Wardas, J., Morelli, M., 1996. Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behavior and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1176–1181.
- Pinna, A., Fenu, S., Morelli, M., 2001. Motor stimulant effects of the adenosine A2A receptor antagonist Sch 58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Synapse* 39, 233–238.
- Pinna, A., Pontis, S., Morelli, M., 2006. Expression of dyskinetic movements and turning behavior in subchronic L-DOPA 6-hydroxydopamine-treated rats is influenced by the testing environment. *Behav. Brain Res.* 171, 175–178.
- Pinna, A., Pontis, S., Borsini, F., Morelli, M., 2007. Adenosine A2A receptor antagonists improve deficits in initiation of movement and sensory motor integration in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse* 61, 606–614.
- Pinna, A., Tronci, E., Schintu, N., Simola, N., Volpini, R., Pontis, S., et al., 2010. A new ethyladenine antagonist of adenosine A(2A) receptors: behavioral and biochemical characterization as an antiparkinsonian drug. *Neuropharmacology* 58, 613–623.
- Pisani, A., Fezza, F., Galati, S., Battista, N., Napolitano, S., Finazzi-Agrò, A., et al., 2005. High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann. Neurol.* 57, 777–779.
- Romero, J., Berrendero, F., Pérez-Rosado, A., Manzanares, J., Rojo, A., Fernández-Ruiz, J.J., et al., 2000. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci.* 66, 485–494.
- Rose, S., Ramsay Croft, N., Jenner, P., 2007. The novel adenosine A2a antagonist ST1535 potentiates the effects of a threshold dose of L-DOPA in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* 1133, 110–114.
- Salamone, J.D., Mayorga, A.J., Trevitt, J.T., Cousins, M.S., Conlan, A., Nawab, A., 1998. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. *Prog. Neurobiol.* 56, 591–611.
- Salamone, J.D., Betz, A.J., Ishiwari, K., Felsted, J., Madson, L., Mirante, B., et al., 2008. Tremorolytic effects of adenosine A2A antagonists: implications for parkinsonism. *Front. Biosci.* 13, 3594–3605.
- Salim, H., Ferré, S., Dalal, A., Peterfreund, R.A., Fuxe, K., Vincent, J.D., et al., 2000. Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably transfected human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 74, 432–439.
- Schwarzschild, M.A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J.F., Morelli, M., 2006. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 29, 647–654.
- Simola, N., Fenu, S., Baraldi, P.G., Tabrizi, M.A., Morelli, M., 2004. Blockade of adenosine A2A receptors antagonizes parkinsonian tremor in the rat tacrine model by an action on specific striatal regions. *Exp. Neurol.* 189, 182–188.
- Simola, N., Fenu, S., Baraldi, P.G., Tabrizi, M.A., Morelli, M., 2006. Dopamine and adenosine receptor interaction as basis for the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 248, 48–52.
- Soria, G., Castañé, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O., 2004. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2203–2213.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Aubert, I., Burbaud, P., Fredholm, B.B., Bloch, B., 1998. Cellular distribution of adenosine A2A receptor mRNA in the primate striatum. *J. Comp. Neurol.* 399, 229–240.

- Tebano, M.T., Martire, A., Chiodi, V., Pepponi, R., Ferrante, A., Domenici, M.R., et al., 2009. Adenosine A2A receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB1 receptors in the rodent striatum. *J. Neurochem.* 110, 1921–1930.
- Tozzi, A., de Lure, A., Di Filippo, M., Tantucci, M., Costa, C., Borsini, F., et al., 2011. The distinct role of medium spiny neurons and cholinergic interneurons in the D2/A2A receptor interaction in the striatum: implications for Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 31, 1850–1862.
- Tronci, E., Simola, N., Borsini, F., Schintu, N., Frau, L., Carminati, P., et al., 2007. Characterization of the antiparkinsonian effects of the new adenosine A2A receptor antagonist ST1535: acute and subchronic studies in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 94–102.
- 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.
- Ungerstedt, U., 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367, 69–93.
- van der Stelt, M., Fox, S.H., Hill, M., Crossman, A.R., Petrosino, S., Di Marzo, V., et al., 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.* 19, 1140–1142.
- Yin, H.H., Lovinger, D.M., 2006. Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8251–8256.

3.5 Falta de lateralización en la neurotransmisión mediada por el receptor de dopamina D₁ en la disquinesia.

Daniel Farré^{a,*}, Ana M. Muñoz^{b,d,*}, Estefanía Moreno^{a,b,*}, Irene Reyes-Resina, Júlia Canet-Pons^a, Iria G. Dopeso-Reyes^{b,c}, Alberto J. Rico^{b,c}, Carmen Lluís^{a,b}, Josefa Mallol^{a,b}, Gemma Navarro^{a,b}, Enric I. Canela^{a,b}, Antoni Cortés^{a,b}, José L. Labandeira^d, Vicent Casadó^{a,b,&}, José L. Lanciegob,^{c,&} Rafael Franco^{a,&}

a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona, España

b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, España

c Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, España

d Departamento de Ciencias Morfológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

* Estos autores contribuyeron equitativamente en este trabajo.

& Autores sénior del manuscrito.

Manuscrito enviado a Molecular Neurobiology

Los receptores de dopamina D₃, que son considerados como dianas terapéuticas para la disquinesia en los pacientes parkinsonianos, forman heterómeros con los receptores D₁ de dopamina. Investigando la expresión de heterómeros de receptores D₁-D₃ encontramos un incremento marcado en el cerebro de ratas hemilesionadas con la neurotoxina 6-OHDA que desarrollan disquinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA. La heteromerización fue evaluada sobre muestras estriatales de modelos parkinsonianos tanto de rata como de primates no humanos, mediante la aparición de *cross-talk* a nivel de unión de radioligandos y/o de ensayos de ligación por proximidad *in situ*. Aparte de la detección de heterómeros, los experimentos de unión e una lateralización de los receptores D₁, observándose una afinidad más alta en el estriado izquierdo. En los animales disquinéticos, pero no en los lesionados o solamente tratados con L-DOPA, el incremento de los heterómeros de receptores D₁-D₃ parece ser responsable de la alta sensibilidad en la señalización mediada por el receptor D₁. Esto es debido en particular por el incremento en la afinidad del receptor D₁ por la dopamina mediada por el receptor D₃ en el lado derecho, volviéndose similar a la del lado izquierdo. La disquinesia es consecuencia o causa de un equilibrio en la neurotransmisión mediada por el D₁ en el estriado izquierdo y derecho.

Molecular Neurobiology

Stronger D1-receptor mediated neurotransmission in dyskinesia

--Manuscript Draft--

| | |
|--|--|
| Manuscript Number: | MOLN-D-14-00274 |
| Full Title: | Stronger D1-receptor mediated neurotransmission in dyskinesia |
| Article Type: | Molecular Mechanisms and Synaptic Plasticity in Neurological Disease |
| Corresponding Author: | Rafael Franco University of Barcelona Barcelona, SPAIN |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | University of Barcelona |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Daniel Farré |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Daniel Farré |
| | Ana M Muñoz, PhD |
| | Estefania Moreno |
| | Irene Reyes-Resina |
| | Júlia Canet |
| | Iria G Dopeso-Reyes |
| | Alberto J Rico |
| | Carme Lluís |
| | Josefa Mallol |
| | Gemma Navarro, PhD |
| | Enric I Canela |
| | Antonio Cortés |
| | José L Labandeira-García |
| | Vicent Casadó |
| | José L Lanciego |
| | Rafael Franco |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Abstract: | Dopamine D3 receptors, which are considered therapeutic targets for dyskinesia in parkinsonian patients, form heteromers with dopamine D1 receptors. On looking for D1-D3 receptor heteromer expression we found a marked increase in the brain of 6-hydroxy-dopamine-hemilesioned rats rendered dyskinetic by treatment with 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA). Heteromerization was assessed in striatal samples from both rodent and non-human primate parkinsonian models by cross-talk at the radioligand binding level and by in situ proximity ligation assays. Apart from detecting heteromers, binding assays showed a lateralization of dopamine D1 receptors whose affinity was higher in the left striatum. In dyskinetic animals the increase in D1-D3 receptor heteromers seems responsible for higher sensitivity in D1 receptor-mediated signaling. This is particularly due to the D3 receptor-mediated increase in affinity of dopamine for the D1 receptor in the right side that becomes |



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Bioquímica

Rafael Franco

i Biologia Molecular (Fac Biologia)

Edifici Prevosti

Catedràtic

Diagonal 645. 08028 Barcelona

Tel. 93 402 12 08

E-mail: rfranco@ub.edu

Molecular Neurobiology

July 18th, 2014

Dear Editor,

Please find enclosed the original manuscript entitled

Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia

by Farré et al., in order to be considered for publication in Molecular Neurobiology.

In our opinion the findings in this report constitute an advance in the understanding the molecular mechanism linking abnormal dopamine neurotransmission and dyskinesias appearing in Parkinson's disease patients after sustained L-DOPA treatment .

We are looking forward to hearing from you

Best regards

Rafael Franco

Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia

Daniel Farré^{1*}, Ana M. Muñoz^{2,4,*}, Estefanía Moreno^{1,4,*}, Irene Reyes-Resina³, Julia Canet¹, Iria G. Dopeso-Reyes^{3,4}, Alberto J. Rico^{3,4}, Carme Lluís^{1,4}, Josefa Mallo^{1,4}, Gemma Navarro^{1,4}, Enric I. Canela^{1,4}, Antonio Cortés^{1,4}, José L. Labandeira-García^{2,4}, Vicent Casadó^{1,4,&}, José L. Lanciego^{3,4,&} and Rafael Franco^{1,&}

1. Laboratory of Molecular Neurobiology. Department of Biochemistry and Molecular Biology. Faculty of Biology. University of Barcelona. Barcelona. Spain.

2. Laboratory of Neuroanatomy and Experimental Neurology. Department of Morphological Sciences, Center for Research in Molecular Medicine and Chronic Diseases (CIMUS). University of Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. Spain.

3. Neuroscience Department, Center for Applied Medical Research (CIMA). University of Navarra. Pamplona. Spain.

4. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Spain.

Correspondence address:

Rafael Franco

Department of Biochemistry and Molecular Biology.

Faculty of Biology. Universitat de Barcelona.

Diagonal 645. Preosti Building. 08028 Barcelona. Spain

rfranco@ub.edu

rfranco123@gmail.com

+34-934021208 FAX +34-934021215

* These authors contributed equally to this paper.

& Senior authors of the manuscript

Running title

Dopamine D₁-D₃ receptor heteromers in dyskinesia

Keywords

Basal ganglia, *caudate*, D₃ receptors, direct pathway, L-DOPA, dopamine receptor heteromers, *Macaca fascicularis*, non-human primate, *putamen*, indirect pathway, Parkinson's.

Abbreviations

6-OHDA: 6-hydroxy dopamine, L-DOPA: 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine; DPAT: 7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. PIPAT: 7-hydroxy-2-[N-n-propyl-N-(3'-iodo-2'-propenyl)-amino]tetralin.

Abstract

Dopamine D₃ receptors, which are considered therapeutic targets for dyskinesia in parkinsonian patients, form heteromers with dopamine D₁ receptors. On looking for D₁-D₃ receptor heteromer expression we found a marked increase in the brain of 6-hydroxy-dopamine-hemilesioned rats rendered dyskinetic by treatment with 3, 4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA). Heteromerization was assessed in striatal samples from both rodent and non-human primate parkinsonian models by cross-talk at the radioligand binding level and/or by *in situ* proximity ligation assays. Apart from detecting heteromers, binding assays showed a lateralization of dopamine D₁ receptors whose affinity was higher in the left striatum. In dyskinetic, but not in lesioned or L-DOPA-treated animals, the increase in D₁-D₃ receptor heteromers seem responsible for higher sensitivity in D₁ receptor-mediated signaling. This is particularly due to the D₃ receptor-mediated increase in the affinity of dopamine for the D₁ receptor in the right side that becomes similar to that in the left side. Dyskinesia results from or causes a balancing of D₁-mediated transmission in left/right striatum.

Introduction

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder caused by the degeneration of the pigmented neurons of the *substantia nigra pars compacta* that provide dopamine input to the striatum, which contains two subtypes of GABAergic efferent neurons that express different dopamine receptors. Those neurons give rise to the direct (motor activation) and indirect (motor depression) basal ganglia pathways of motor control. Thus, whereas dopamine D₁ receptor is mainly expressed in the GABAergic SP-dynorphinergic neurons (direct pathway), the dopamine D₂ receptor is especially expressed in the GABAergic enkephalinergic neurons (indirect pathway) [1,2]. The function of the dopaminergic system in the striatum is lateralized during voluntary movements [3], and alterations in the interhemispheric ratio of dopamine receptors binding conceivably may disrupt the normally lateralized function of this system, and thereby contribute to neuropathological changes in human brain [4]. Dopamine D₃ receptor has a relatively low expression in the striatum [5]. The most effective and most commonly used symptomatic treatment for Parkinson's disease is still *levodopa* (L-DOPA: 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) combined with a peripheral L-DOPA decarboxylase inhibitor, such as *carbidopa* [6-8]. However, as the disease progresses, the therapeutic index of L-DOPA decreases and its anti-parkinsonian effect is very often associated with adverse effects, including progressive decline in symptomatic benefit (end-of-dose wearing-off and on phenomena) and dyskinesia [9,10]. The higher the striatal dopamine denervation, the lower the threshold at which the dopamine agonist primes for the appearance of dyskinesia.

Although the underlying striatal mechanism is not known, L-DOPA-induced dyskinesia, once “primed”, seems to be persistent and even permanent [9]. L-DOPA-induced dyskinesia is accompanied by an increase of D₁ receptor signaling and an up-regulation of D₃ receptors [11]. Hence, dopamine D₃ receptors have been proposed as a target in parkinsonian and non-parkinsonian dyskinesias [12-18].

It is becoming accepted that G-protein-coupled receptors (GPCRs) form homo and heteromers that are the actual target of L-DOPA-based anti-parkinsonian therapy [19,20]. Interestingly, heteromers may be formed by receptors for the same neurotransmitter. One example is the dopamine D₁ and D₂ receptor heteromer [21-24]. It has been also demonstrated that D₃ receptors co-localize, form heteromers and show an intra-membrane cross-talk with dopamine D₁ receptors in living cells and in the striatum [25]. On the one hand, resonance energy transfer techniques have proved that D₁ and D₃ receptors heteromerize in heterologous systems co-expressing the human D₁ and D₃ receptors. Besides, complementary studies in two different laboratories have demonstrated the existence of particular properties of the D₁-D₃ receptor heteromer that impact on signaling and receptor trafficking [26,25]. Heteromerization with D₃ receptors could therefore be a mechanism by which striatal D₁ receptor could increase its sensitivity to dopamine. The aim of this paper was to assess whether up-regulation of D₃ receptors affects, in dyskinesia, the degree of D₁-D₃ heteromerization. In this work we identified D₁-D₃ receptor heteromers in the rat and primate striatum of both *naïve* and lesioned animals, and assessed how receptor heteromer expression and biochemical properties were affected in L-DOPA-induced dyskinesia.

Materials and methods

Animals and treatments

Rats

Male Wistar rats were used. All experiments were carried out in accordance with EU directives (2010/63/EU and 86/609/CEE) and were approved by the Ethical committee of the University of Santiago de Compostela. Animals were divided into three groups as follows: non-lesioned rats (n=10); 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned animals receiving vehicle (n=10) and 6-OHDA-lesioned animals receiving a chronic treatment with L-DOPA (n=28). Lesioned-group rats were anesthetized with ketamine/xylazine (1% Ketamine, 75mg/kg; 2% xylazine, 10 mg/kg), placed in a David Kopf stereotaxic apparatus and received a unilateral injection in the right medial forebrain bundle of 12 µg of 6-OHDA HBr Sigma; prepared in 4 µL of sterile saline containing 0.2% ascorbic acid. The stereotaxic coordinates were 3.7 mm posterior to bregma, -1.6 mm lateral to midline and 8.8 mm ventral to the skull at the midline, in the flat skull

position [27]. The solution was injected with a 5- μ L Hamilton syringe coupled to a motorized injector (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) at 1 μ L/min, and the canula was left *in situ* for 2 minutes after injection. Three weeks later the efficacy of the lesion was evaluated by the amphetamine rotation and the cylinder test. The correct nigrostriatal lesion was confirmed by the loss of tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry staining.

Amphetamine-induced rotation was tested in a bank of 8 automated rotometer bowls (Rotacount 8, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) by monitoring full (360°) body turns in either direction. Right and left full body turns were recorded over 90 min following an injection of D-amphetamine (2.5 mg/kg i.p) dissolved in saline. Rats that displayed more than 6 full body turns/min ipsilateral to the lesion were included in the study (this rate would correspond to more than 90% depletion of dopamine fibers in the striatum, [28]).

Spontaneous forelimb use was evaluated by the cylinder test [29,30]. Rats were placed individually in a glass cylinder (20 cm in diameter), and the number of left or right forepaw contacts were scored by an observer blinded to the animals' identity and presented as left (impaired) touches in percentage of total touches. A control animal would thus receive an unbiased score of 50%, whereas lesion usually reduces performance of the impaired paw to less than 20% of total wall contacts.

Animals treated with L-DOPA received a daily injection with L-DOPA methyl ester (6 mg/kg) s.c plus benserazide (10 mg/kg) for three weeks (such treatment knowingly induces dyskinetic movements). In order to discriminate dyskinetic from non-dyskinetic animals, the manifestation of L-DOPA-induced AIMS (abnormal involuntary movements) was evaluated according to the rat dyskinesia scale described in detail previously [31,32]. The severity of each AIM subtype (limb, orolingual, axial) was assessed using scores from 0 to 4 (1: occasional, i.e. present < 50% of the time; 2: frequent, i.e. present >50% of the time; 3: continuous, but interrupted by strong sensory stimuli; 4: continuous, not interrupted by strong sensory stimuli). The animals with higher scores were used for further studies.

Six hours after the last injection of vehicle or L-DOPA, animals were sacrificed by decapitation and brains removed rapidly. Brain areas containing the striatum (both from the lesioned and intact hemispheres) were dissected out and immediately frozen on dry ice until use. A subgroup of animals were perfused, first with 0.9% saline and then with cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were removed, washed, and cryoprotected in the same buffer containing 20% sucrose, and finally cut on a freezing microtome (40 μ m thick) for proximity ligation assays.

Monkeys

All animals were captive-bred and supplied by Harlan Laboratories: also they were naïve before treatments. A total of six naïve adult male *Macaca fascicularis* primates (body weight 3.8 - 4.5 kg) were used in this study. Animal handling was conducted in accordance with the European Council Directive 86/609/EEC, as well as in agreement with the Society for Neuroscience Policy on the Use of Animals in Neuroscience Research. The experimental design was approved by the Ethical Committee for Animal Testing of the University of Navarra as well as by the Department of Health from the Government of Navarra (ref: NA-UNAV-04-08).

The dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP; Sigma catalogue number M0896) was administered intravenously to four macaques at a concentration of 0.3 mg/kg (injected weekly) until animal reached a stable parkinsonian syndrome. The severity of the MPTP-induced parkinsonism was evaluated using clinical rating scales [33] where the highest score was 29. The clinical features used in this scale included: facial expression (0-3), resting tremor (0-3), action or intention tremor (0-3), posture (0-3), gait (0-2), bradykinesia (0-3), bradykinesia (0-4), balance/coordination (0-3), gross motor skills upper limb (0-3), gross motor skills lower limb (0-3), defense reaction (0-2). The MPTP-treated macaque reached a stable score between 19 to 23 points that was maintained over the 3-month MPTP washout. The extent of the MPTP-induced dopaminergic depletion was confirmed by immunohistochemical detection of tyrosine hydroxylase, as shown in Bonaventura et al [19].

Two MPTP-treated monkeys were selected to receive daily oral treatment with L-Dopa and benserazide (25 mg/kg of Madopar, Roche, France). The changes in the score of Kurlan et al. [33] from the “off” to the “on” state were monitored and the duration of the “on” response recorded [34]. LIDs were rated as 1 (mild), when presented only occasionally under stress; 2 (moderate) for LIDs present during most of the ‘on’ period without interfering with voluntary movements; and 3 (severe) when LIDs were continuous, generalized and they perturbed motor behavior. This scoring system is in keeping with the scale included in the Core Assessment Program for Intracerebral Transplantation for Parkinson’s disease [35], subsequently modified and validated for the assessment of dyskinesias in patients [36]. Animals were treated daily with L-DOPA until they showed an overt dyskinetic syndrome; a mild dyskinetic syndrome was displayed by the end of the first month of treatment and the overt dyskinetic symptoms appeared one month later and remained stable until sacrifice. By the time of sacrifice, two monkeys treated with L-DOPA showed severe dyskinesia. These primates entered in the “on” state 30 min post-L-DOPA oral delivery and the duration of the “on” period was maintained for 2.5-3 h. L-DOPA-treated animals were killed in the ON state, when they showed peak-of-dose dyskinesia.

Animals were anesthetized with an overdose of 10% chloral hydrate and perfused transcardially. The perfusates consisted of a saline Ringer solution followed by 3,000 ml of a fixative solution containing 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.125 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Perfusion was continued with 1,000 ml of a cryoprotectant solution containing 10% glycerin and 2% dimethylsulphoxide (DMSO) in 0.125 M PB, pH 7.4. Once perfusion was completed, the skull was opened, the brain removed and stored for 48 h in a cryoprotectant solution containing 20% of glycerin and 2% DMSO in 0.125 M PB, pH 7.4. All solutions used for fixation and cryoprotection were treated with 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) and autoclaved prior to their use. Finally, frozen serial sagittal or coronal sections (40 µm-thick) were obtained on a sliding microtome and collected in 0.125 M PB cryoprotectant solution containing 20% of glycerin and 2% DMSO in 0.125 M PB, pH 7.4, as 10 series of adjacent sections. Basal ganglia-related structures were selected according to the atlas of Lanciego and Vazquez [37].

Immunohistochemistry

Rat striatal sections were thawed at 4 °C, washed in Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.9% pH 7.8 buffer (TBS), treated 5 min with 1% Na₂BH₄ dissolved in TBS, followed by successive TBS washes until all Na₂BH₄ was eliminated and rocked in 7% normal donkey serum (SND, Sigma) in TBS for 1 h at 37 °C in a humidified atmosphere. The sections were then incubated overnight at 4 °C in a humidified atmosphere with the primary antibody rabbit anti-D₃ receptor antibody (1:200, see above) or guinea pig anti-D₁ receptor antibody (1:200, see above) in a solution with 0.1% TBS-Tween, 0.1% BSA Acetylated (Aurion, Wageningen, The Netherlands), 7% SND. Then, sections were washed in TBS-Tween 0.05% and left for 2 h at room temperature in a humidified atmosphere with chicken anti-rabbit (1:200, Alexa Fluor 594, Invitrogen) or goat anti-guinea pig (1:200, Alexa Fluor 488, Invitrogen) as secondary antibody in 0.1% TBS-Tween, 0.1% BSA, 7% SND. Finally sections were washed in TBS-Tween 0.05%, followed by a single wash in TBS before mounting in Mowiol medium (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), covered with a glass and left to dry at 4 °C for 24 h. The sections were observed and imaged in a Leica SP2 confocal microscope.

***In situ* proximity ligation assays**

Monkey and rat sections were mounted on gelatin-coated slides and D₁-D₃ receptor heteromers were detected using the Duolink II *in situ* proximity-ligation-assay (PLA) detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden) following the instructions of the supplier. Sections were thawed at 4°C, washed in 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized

with TBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min and successively washed with TBS. After 1 h incubation at 37°C with the blocking solution in a pre-heated humidity chamber (37°C), sections were incubated overnight in the antibody diluent medium with a mixture of equal amounts of rabbit anti-D₃ receptor antibody (1:200, ref.A1402, LifeSpan BioSciences, Fourth Avenue, Seattle, USA) and guinea pig anti-D₁ receptor antibody (1:200, ref.Af500, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan). Sections were washed as indicated by the supplier and incubated for 2 h in a pre-heated humidity chamber at 37°C with PLA probes detecting rabbit or guinea pig antibodies, Duolink II PLA probe anti-rabbit plus and Duolink II PLA probe anti-guinea pig minus. Then samples were processed for ligation and amplification and were mounted using a DAPI-containing mounting medium. The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (N.A. 1.4), and a 405 nm and a 561 nm laser lines. For each field of view a stack of two channels (one per staining) and 9 to 15 Z stacks with a step size of 1 µm were acquired. A quantification of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and the ratio r (number of red spots/cells containing spots), were determined using the Fiji package (<http://pacific.mpi-cbg.de/>). Nuclei and red spots were counted on the maximum projections of each image stack. After getting the projection each channel was processed individually. The nuclei were segmented by filtering with a median filter, subtracting the background, enhancing the contrast with the Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) plug-in and finally applying a threshold to obtain the binary image and the regions of interest (ROI) around each nucleus. Red spots images were also filtered and thresholded to obtain the binary images. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc multiple comparison test was used to compare the values (% of positive cells or ratio r) obtained for each pair of receptors in different disease stages or in different striatal regions.

Preparation of rat brain striatal membranes and protein determination

Rat striatal tissue was disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 20 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for three 5 s- periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, 1/1000). After eliminating cell debris by centrifugation at 1000 ×g for 10 min, membranes were obtained by centrifugation at 105,000 ×g (40 min, 4°C) and the pellet was suspended and centrifuged again under the same conditions. Membrane pellets were stored at -80°C and were washed once more as described above and re-suspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Protein concentration

was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard.

Radioligand binding assays

Membrane suspensions (0,2 mg of protein/ml) were preincubated 2 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM MgCl₂ with 1 nM of the D₁ receptor antagonist [³H]R-(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetra-hydro-1H-3-benzazepine ([³H]SCH-23390), and increasing concentrations of the partial D₁ receptor agonist (±)-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-(1H)-3-benzazepine-7,8-diol hydrobromide (SKF-38393, triplicates of 15 different competitor concentrations from 0.01 nM to 50 μM), in the absence or the presence of 100 nM of the D₃ receptor agonist 7-OH-PIPAT (7-hydroxy-2-[N-n-propyl-N-(3'-iodo-2'-propenyl)-amino]tetralin). For binding to D₃ receptors, membranes were incubated with 4 nM of the D₃ receptor agonist [³H]7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin ([³H] 7-OH-DPAT ([³H]7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin, Amersham Biosciences) and increasing concentrations of the D₃ receptor agonist 7-OH-DPAT (triplicates of 15 different competitor concentrations from 0.1 nM to 50 μM; Sigma). Nonspecific binding was determined in the presence of 50 μM SCH-23390 for the D₁ receptor or 50 μM of the D₃ receptor ligand 7-OH-DPAT.

Binding data analysis

Radioligand competition curves were analyzed by nonlinear regression using the commercial Graphpad and Grafit curve-fitting software (Erithacus Software, Surrey, UK), by fitting the binding data to the mechanistic two-state dimer receptor model [38,39]. We consider the possibility of a homodimer as the minimal structural unit of a receptor forming homomers or forming heteromers with another receptor. To calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants the two-state dimer model was used [40] and data from saturations assays were fitted using the following equation:

$$A_{\text{total bound}} = (K_{DA2}A + 2A^2)R_T / (K_{DA1} + K_{DA2}A + A^2) + A_{\text{non-specific. bound}} \quad \text{eq. 1}$$

where A represents free radioligand concentration, R_T is the total amount of receptor dimers and K_{DA1} and K_{DA2} are the macroscopic equilibrium dissociation constants describing the binding of the first and the second radioligand molecule (A) to the dimeric receptor. When the radioligand (A) shows non-cooperative behavior, K_{DA2} = 4K_{DA1} [39]; and, therefore, K_{DA1} is enough to characterize the binding of A. K_{DA1} values obtained from saturations experiments

were: 0.6 nM for [³H]SCH-23390 binding and 4.0 nM for [³H]DPAT binding. These values are needed to fit data from competition experiments (see below).

Data from competition binding experiments were fitted using the following equation:

$$A_{\text{total bound}} = (K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB}) R_T / (K_{DA1}K_{DA2} + K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB / K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B / K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B^2 / (K_{DB1}K_{DB2})) + A_{\text{non-specific bound}} \quad \text{eq. 2}$$

where B represents the assayed competing compound concentration, and K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the macroscopic equilibrium dissociation constants for the binding of the first competitor molecule (B) to a dimer and for the binding of the second competitor molecule (B) to the semi-occupied dimer; K_{DAB} is the hybrid equilibrium radioligand/competitor dissociation constant, which is the dissociation constant of B binding to a receptor dimer semi-occupied by A. When the radioligand (A) shows non-cooperative behavior, eq. 2 can be simplified to eq. 3 due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$ [39]; and, therefore, K_{DA1} is enough to characterize the binding of A:

$$A_{\text{total bound}} = (4K_{DA1}A + 2A^2 + 4K_{DA1}AB / K_{DAB}) R_T / (4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB / K_{DAB} + 4K_{DA1}^2B / K_{DB1} + 4K_{DA1}^2B^2 / (K_{DB1}K_{DB2})) + A_{\text{non-specific bound}} \quad \text{eq. 3}$$

Goodness of fit [41]; was tested according to reduced chi-squared value given after data fitting. The test of significance for two different model population variances was based upon the F-distribution. Using this F-test, a probability greater than 95% ($p < 0.05$) was considered the criterion to select a more complex model over the simplest one. Competition curves for each animal were performed in triplicates to obtain accurate parameter values. Differences were analyzed for significance by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc multiple comparison test.

Results

Expression D₁ and D₃ receptors in the striatum of L-DOPA-treated parkinsonian rats

The 6-OHDA rat model of Parkinson's disease is prepared by unilateral neurotoxin injection on the right hemisphere. Although the expression of the D₃ receptor is relatively low in striatum, repeated L-DOPA treatment in parkinsonian animals induces ectopic striatal D₃ expression in the dorsal striatum [12,14]. Saturation experiments using increasing concentrations of [³H] 7-OH-DPAT were performed. Saturation curves were monophasic (data not shown) and data

were fitted to eq. 1 to calculate R_T and, from this value, the maximum binding (B_{max} is twice the number of dimers, R_T). In both ipsi- and contralateral hemispheres a very low expression of D_3 receptors was observed in naïve rats and in both hemispheres of lesioned animals. Interestingly, the D_3 receptor expression was significantly increased in the ipsi- and contralateral sides of rats that developed severe dyskinesia after L-DOPA treatment (Fig. 1). Saturation experiments using increased concentration of [3 H]SCH-23390 were performed to measure D_1 receptor levels. In all cases the competition curves were monophasic (data not shown). From fitting the binding data to eq. 1 we calculated R_T and, from this value, the maximum binding (B_{max} is twice the number of dimers, R_T). The level of the D_1 receptor, calculated as B_{max} , was similar in all samples (Fig. 1). These results indicate a marked increase in D_3 receptor expression that correlated with the appearance of dyskinesia. The increase in D_3 receptor expression in dyskinesia was also observed by immunocytochemistry using sections from naïve and dyskinetic rats (Fig. 1C-D).

Expression of D_1 - D_3 receptor heteromers in the rat striatum

To test whether the increase of D_3 receptor expression in L-DOPA-induced dyskinesia leads to an increase in D_1 - D_3 receptor heteromers, *in situ* Proximity Ligation Assays (PLA) were performed. Labeling heterodimers by PLA requires both receptors to be sufficiently close to allow the two antibody-DNA probes to form double stranded segments, a signal that is further amplified in the presence of fluorescent nucleotides [42,43]. Thus, the detection of a punctuate -red- fluorescent signal by confocal microscopy is dependent on the close proximity of the receptors. In these experiments, specific primary antibodies directed against each of the two receptors were used: a guinea pig anti- D_1 receptor antibody whose specificity has been described previously [44], and a rabbit anti- D_3 , whose specificity for D_3 has been characterized for immunohistochemistry comparing striatal samples from naïve and dyskinetic animals. In naïve rats, the number of red spots around the DAPI-stained nuclei was low (Fig. 2). Staining was observed in less than 50% cells, each having around 2 red spots/cell (Fig. 2). Similar results were obtained in ipsi- and contralateral hemi-striatal sections from lesioned rats (Fig. 2B-C). These results agree with the D_3 receptor expression quantified by radioligand binding (B_{max} values in Fig. 1). Concomitantly, the PLA staining increased in dyskinetic rats (Fig. 2D); compared to naïve rats, the percentage of cells expressing red spots increased (> 60% of positive cells) as also increased the number of red spots/cell (around 4) (Fig. 2). Few red spots were observed in samples treated with only one primary antibody (negative controls in Fig. 2E). These results indicate that the D_3 receptor expression induced by dyskinesia correlates

with a significant increase in heteromer expression, meaning that D₁-D₃ receptor heteromers may be targets for dyskinesia.

Expression of D₁-D₃ receptor heteromers in the monkey striatum

Having previously demonstrated the presence of D₁-D₃ receptor heteromers in rat striatum, we next investigated their expression in *Macaca fascicularis*, taking advantage of the fact that the regions of interest within the striatum are more clearly delineated in the brains of primates than in rats or other non-primate models. In fact, the MPTP-primate model is considered the gold standard for Parkinson's disease pre-clinical research due to its resemblance, in neurodegeneration and symptoms, to the human disease. By incubating monkey *caudate nucleus* and *putamen* sections with the corresponding antibodies we observed red spots in neurons with DAPI-stained nuclei. Positive neurons were found in control monkeys (Fig. 3B-B', F-F'), MPTP-treated monkeys (Fig. 3C-C', G-G') and macaques rendered dyskinetic by chronic L-DOPA treatment (Fig. 3D-D', H-H'). No red spots were observed in samples treated with only one primary antibody (Fig. 3A-A', E-E'). In all cases, staining was observed in a relatively high percentage of cells, approximately a 50% in naïve and MPTP animals and >65% in dyskinetic animals. The percentage of positive cells and the number of red spots/cell for D₁-D₃ receptor heteromers were dissimilar between samples ($p < 0.01$ by two-way ANOVA) and, compared with either control or MPTP-treated animals, a significant increase in both *caudate nucleus* and *putamen* was observed in dyskinetic monkeys (Fig. 3 I).

D₁-D₃ inter-receptor interaction in the striatum of dyskinetic rats

Before analyzing the cross-talk at the ligand binding level, the affinity of the D₁ receptor partial agonist, SKF-38393, was determined by competition assays (using [³H]SCH-23390 as radioligand) in both hemispheres of naïve, lesioned (non-dyskinetic) and dyskinetic animals. The results (table 1) show a clear asymmetry in right versus left striatum from naïve animals; the affinity was significantly different in the two hemispheres and the left one displayed a significantly lower K_{DB1} values ($p < 0.001$ by two-way ANOVA), i.e. a higher affinity. Similar lateralization was detected in samples from lesioned, L-DOPA-treated (non-dyskinetic) and dyskinetic animals. These results constitute evidence for right/left asymmetry in D₁ receptor affinity for its ligands that likely reflects a different D₁ receptor context in the two hemispheres.

Lateralization may be due to differential right vs. left allosteric interactions affecting the D₁ receptor structure. Irrespective of whether the allosteric interactions explaining the asymmetry are due to heteromerization or not, our next aim was to detect the biochemical

fingerprint of the D₁-D₃ receptor heteromer in striatum. A common characteristic of receptor heteromers is that ligand binding to one receptor can modulate ligand binding to the partner receptor in the heteromer [45]. This biochemical cross-talk constitutes a fingerprint of the heteromer and it is known that D₃ receptor stimulation enhances D₁ receptor agonist affinity in transfected cells and calf striatum [25]. Due to both financial and ethical issues, these experiments could not be attempted using primate samples; in fact the binding experiments require a high amount of fresh tissue that was not available from primates. Therefore D₁-D₃ receptor cross-talk identification was performed in the two hemispheres of naïve, lesioned, L-DOPA-treated (non dyskinetic) and dyskinetic rats. In the different rat striatal samples competition experiments using 1 nM of the D₁ receptor antagonist [³H]SCH-23390 binding vs. increasing concentrations of the partial D₁ receptor agonist SKF-38393, were performed in the absence or the presence of 100 nM of the D₃ receptor agonist 7-OH-PIPAT. Any effect of 7-OH-PIPAT upon the competition curves would indicate positive cross-talk between D₁-D₃ receptors, likely due to receptor heteromerization. In samples from the two hemispheres naïve, lesioned and L-DOPA-induced dyskinetic animals the competition curves were biphasic due to negative cooperativity (Fig. 4) and the affinity constants (table 1) for SKF-38393 binding to D₁ receptor were calculated by fitting data to the two-state dimer model (eq. 3; see Methods). The positive cross-talk consisting in binding with higher SKF-38393 affinity to D₁ receptors in the presence of PIPAT was not observed in naïve or non-dyskinetic animals in any of the hemispheres (Fig. 4 A; table 1). Interestingly, L-DOPA-induced dyskinesia produced the appearance of a notable D₁-D₃ heteromer fingerprint only in the ipsilateral (right) side; it consisted of a significant affinity increase of D₁ receptor agonist SKF-38393 in the presence of the D₃ receptor agonist PIPAT (Fig. 4 B; table 1). It should be noted that this cross-talk in the ipsilateral side correlates with the above-mentioned significant increase in the levels of D₃ receptors (Fig. 1) and of D₁-D₃ receptor heteromers (Fig. 2) in the lesioned hemisphere.

Discussion

The involvement of the direct basal ganglia pathway in dyskinesia is well known. Already in 1997, Bordet and collaborators [12] proved a relationship between D₁ and D₃ receptors in dyskinesia. The authors reported the D₁-receptor-mediated induction of D₃ receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to L-DOPA. Expression of D₃ in L-DOPA-treated animals correlated with enhanced levels of prodynorphin mRNA thus leading to the hypothesis of altered balance between dynorphin and substance P in behavioral sensitization. The occurrence of GPCR heteromers was described in late nineties and D₁-D₃ receptor heteromerization was reported in 2008 by Fiorentini et al [26], and by Marcellino et al [25].

Heteromers were identified in both transfected cells and in rat striatum, and its expression, in both transfected cells and in membrane preparations, leads to a synergy in dopamine affinity thus suggesting a stronger dopaminergic tone in the direct pathway [25]. D₃ receptors also potentiate D₁-receptor signaling in terms of cAMP accumulation [26]. As D₁ [46] and D₃ receptor expression [12] is increased upon chronic L-DOPA treatment the aim of this paper was to investigate whether the expression of heteromers was also increased in L-DOPA-induced dyskinesias. Our results consisting of B_{max} values in striatal samples showed a high increase in D₃ expression in dyskinetic rats.

As a side but very important result we found in naïve rats a right/left asymmetry in the agonist affinity binding to striatal D₁ receptors. As early as in 1982, Schneider et al [47] reported increased level of D₂ receptors in the left striatum of naïve (male Sprague-Dawley) rats. Their results from experiments using a single data point could be due to actual differences in receptor levels or to increased affinity of the striatal D₂ receptor in the left hemisphere. Affinity likely results from the quaternary structure of dopamine receptors that seems to be different in each striatal side. Quaternary structure of GPCRs may be modified by a number of allosteric interactions with other proteins (G proteins and else) and also by heteromerization [48]. The expression of D₃ receptors in naïve and lesioned rats is relatively small and, therefore, it is not expected that differential D₃-receptor expression in the two hemispheres would contribute to the right/left asymmetry in D₁ receptors' affinity. The positive cross-talk, which was only found in samples from dyskinetic animals, abrogated lateralization found in naïve and lesioned animals, thus pointing to a physiological disequilibrium in the intact direct pathway. To be sure that such disequilibrium is needed for appropriate motor control will require more experimental effort. Cannon et al [4] have identified by positron emission tomography (PET) a lateral asymmetry in binding of [¹¹C]NNC-112, a D₁ receptor PET radioligand, to the brain of healthy individuals. Brain lateralization in man is a well-known fact apparently underlying right/left hand/arm preference and even the uniqueness of human brain. A study by Silva et al., [49] performed in male black tufted-ear marmoset monkeys showed that the right *caudate/putamen* displayed higher levels of dopamine than the left one. Within the behaviors scored the authors did not find any hand preference but complex interactions (particularly in the left hemisphere) between neurochemical and behavioral data. The authors concluded that data are evidence for functional brain asymmetry [49]. Lateralization occurs even in invertebrate nervous systems (see [50] for review) thus raising the possibility that right/left asymmetry is consubstantial with the inter-species evolution towards a central nervous system. Direct basal pathway seems to be lateralized in mammals and dyskinesia correlate with a balanced right versus left dopamine D₁-receptor

neurotransmission (Fig. 5). Interestingly, lateralization persisted in lesioned animals and in non-dyskinetic lesioned animals treated with L-DOPA. Whether balancing due to L-DOPA-induced activation of D₁ and D₃ receptors (see below) is cause or results from dyskinesia merits further attention.

Heteromerization was tested by detecting the biochemical fingerprint by both PLA and binding assays. Inter-molecular cross-talk within the heteromer often leads to binding modulation, i.e. an allosteric effect due to binding of one ligand to one receptor that is transmitted to the partner receptor [51]. The D₁-D₃ receptor heteromer may be detected by the change in dopamine affinity for D₁ receptor when PIPAT, a D₃-receptor-selective ligand, is included in the assays [52]. Dyskinesia, but not the lesion or a limited treatment with L-DOPA, induced the appearance of a D₁-D₃ receptor heteromer fingerprint consisting of an affinity increase of D₁ receptor agonist SKF-38393 in presence of the D₃ receptor agonist PIPAT. Fig. 5 summarizes our PLA and binding modulation data that show a correlation between dyskinesia and increase in both D₃ and heteromer expression. Expression of oligomers formed by D₁ receptors and NMDA glutamate receptors, which were identified by Lee et al [53] and Fiorentini et al. [54], is altered in 6-OHDA rats rendered dyskinetic by L-DOPA treatment [26,55]. It should be also noted that the expression of D₁-NMDA receptor heteromer decreases in dyskinetic animals. Taken together these results show that dyskinetic rats display a marked dysbalance in the proportion of D₁-receptor-containing heteromers. The decrease in D₁-NMDA receptor heteromers leads to altered long-term potentiation by inhibiting NMDA-mediated currents [53] and the increase in D₁-D₃ receptor heteromers enhances dopamine neurotransmission. Actually in dyskinetic animals treated with L-DOPA in which D₃ receptors are activated within the D₁-D₃ receptor heteromer, the D₁ receptors in the two hemispheres display high affinity. In dyskinetic states excess dopamine coming from L-DOPA treatment would activate D₃ receptors in turn leading to a D₁-receptor mediated super-sensitivity. Indeed these results are consistent with the increased sensitization of D₁-receptor-mediated signaling in *caudate-putamen* from dyskinetic *Macaca fascicularis* primates [56]. The increase in D₁ receptor responsiveness, mimicked by L-DOPA induction of the cAMP/PKA/DARPP-32 pathway has been linked to dyskinesia emergence [57-59,11]. Exacerbated activation of DARPP-32 has been also related to maintenance of L-DOPA-induced dyskinesias [59,60]. Evidence from different laboratories indicates that chronic activation by L-DOPA of the increased number of D₁-D₃ receptor heteromers in dyskinetic animals would lead to a marked potentiation of the direct pathway, which could be of benefit if the indirect pathway is intact. Aberrant activation of the direct pathway together with weak signaling via the indirect pathway (Fig. 5) may underlie the motor imbalance associated to dyskinetic states.

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF2009-07276 and BFU2012-37907, from the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (current name: *Ministerio de Economía y Competitividad*), including FEDER funding (fondo Europeo de desarrollo regional). We thank Manel Bosch, of the *Unitat de Miscroscopia Optica Avançada*, Fac. of Biology, University of Barcelona, for the ImageJ macro to analyze PLA results.

References

1. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250 (4986):1429-1432
2. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30 (5):228-235. doi:10.1016/j.tins.2007.03.008
3. Yamamoto BK, Lane RF, Freed CR (1982) Normal rats trained to circle show asymmetric caudate dopamine release. *Life Sci* 30 (25):2155-2162
4. Cannon DM, Klaver JM, Peck SA, Rallis-Voak D, Erickson K, Drevets WC (2009) Dopamine type-1 receptor binding in major depressive disorder assessed using positron emission tomography and [¹¹C]NNC-112. *Neuropsychopharmacology* 34 (5):1277-1287. doi:10.1038/npp.2008.194
5. Ridray S, Griffon N, Mignon V, Souil E, Carboni S, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (1998) Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. *Eur J Neurosci* 10 (5):1676-1686
6. Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM (1967) Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276 (7):374-379. doi:10.1056/NEJM196702162760703
7. Papavasiliou PS, Cotzias GC, Duby SE, Steck AJ, Fehling C, Bell MA (1972) Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N Engl J Med* 286 (1):8-14. doi:10.1056/NEJM197201062860102
8. Birkmayer W, Hornykiewicz O (1998) The effect of l-3,4-dihydroxyphenylalanine (=DOPA) on akinesia in parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 4 (2):59-60
9. Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG (2000) Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23 (10 Suppl):S2-7
10. Fabbrini G, Brotchie JM, Grandas F, Nomoto M, Goetz CG (2007) Levodopa-induced dyskinesias. *Mov Disord* 22 (10):1379-1389; quiz 1523. doi:10.1002/mds.21475
11. Feyder M, Bonito-Oliva A, Fisone G (2011) L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission. *Front Behav Neurosci* 5:71. doi:10.3389/fnbeh.2011.00071
12. Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz JC (1997) Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (7):3363-3367
13. Bordet R, Ridray S, Schwartz JC, Sokoloff P (2000) Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur J Neurosci* 12 (6):2117-2123
14. Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001) BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411 (6833):86-89. doi:10.1038/35075076
15. Bezard E, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Boraud T, Gross C, Sokoloff P (2003) Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. *Nat Med* 9 (6):762-767. doi:10.1038/nm875
16. Rietschel M, Krauss H, Muller DJ, Schulze TG, Knapp M, Marwinski K, Maroldt AO, Paus S, Grunhage F, Propping P, Maier W, Held T, Nothen MM (2000) Dopamine D3 receptor variant and tardive dyskinesia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250 (1):31-35
17. Visanji NP, Fox SH, Johnston T, Reyes G, Millan MJ, Brotchie JM (2009) Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 35 (2):184-192. doi:10.1016/j.nbd.2008.11.010

18. Cote SR, Chitravanshi VC, Bleickardt C, Sapru HN, Kuzhikandathil EV (2014) Overexpression of the dopamine D3 receptor in the rat dorsal striatum induces dyskinetic behaviors. *Behav Brain Res* 263:46-50. doi:10.1016/j.bbr.2014.01.011
19. Bonaventura J, Rico AJ, Moreno E, Sierra S, Sanchez M, Luquin N, Farre D, Muller CE, Martinez-Pinilla E, Cortes A, Mallol J, Armentero MT, Pinna A, Canela EI, Lluís C, McCormick PJ, Lanciego JL, Casado V, Franco R (2014) L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology* 79:90-100. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.036
20. Pinna A, Bonaventura J, Farre D, Sanchez M, Simola N, Mallol J, Lluís C, Costa G, Baqi Y, Muller CE, Cortes A, McCormick P, Canela EI, Martinez-Pinilla E, Lanciego JL, Casado V, Armentero MT, Franco R (2014) L-DOPA disrupts adenosine A(2A)-cannabinoid CB(1)-dopamine D(2) receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: biochemical and behavioral studies. *Exp Neurol* 253:180-191. doi:10.1016/j.expneurol.2013.12.021
21. Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007) D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2):654-659. doi:10.1073/pnas.0604049104
22. Hasbi A, Fan T, Alijaniam M, Nguyen T, Perreault ML, O'Dowd BF, George SR (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to striatal BDNF production and neuronal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (50):21377-21382. doi:10.1073/pnas.0903676106
23. Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2010) Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* 10 (1):93-99. doi:10.1016/j.coph.2009.09.011
24. Verma V, Hasbi A, O'Dowd BF, George SR (2010) Dopamine D1-D2 receptor Heteromer-mediated calcium release is desensitized by D1 receptor occupancy with or without signal activation: dual functional regulation by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem* 285 (45):35092-35103. doi:10.1074/jbc.M109.088625
25. Marcellino D, Ferre S, Casado V, Cortes A, Le Foll B, Mazzola C, Drago F, Saur O, Stark H, Soriano A, Barnes C, Goldberg SR, Lluís C, Fuxe K, Franco R (2008) Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. *J Biol Chem* 283 (38):26016-26025. doi:10.1074/jbc.M710349200
26. Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, Gotti C, Spano P, Missale C (2008) Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. *Mol Pharmacol* 74 (1):59-69. doi:10.1124/mol.107.043885
27. Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13 (2):139-143
28. Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 10 (2):165-186
29. Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR (1997) Use-dependent structural events in recovery of function. *Adv Neurol* 73:229-238
30. Kirik D, Winkler C, Bjorklund A (2001) Growth and functional efficacy of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 21 (8):2889-2896
31. Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, Bjorklund A (2000) Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 7):1365-1379
32. Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002) Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 15 (1):120-132

33. Kurlan R, Kim MH, Gash DM (1991) Oral levodopa dose-response study in MPTP-induced hemiparkinsonian monkeys: assessment with a new rating scale for monkey parkinsonism. *Mov Disord* 6 (2):111-118. doi:10.1002/mds.870060205
34. Lanciego JL, Rodriguez-Oroz MC, Blesa FJ, Alvarez-Erviti L, Guridi J, Barroso-Chinea P, Smith Y, Obeso JA (2008) Lesion of the centromedian thalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Mov Disord* 23 (5):708-715. doi:10.1002/mds.21906
35. Langston JW, Widner H, Goetz CG, Brooks D, Fahn S, Freeman T, Watts R (1992) Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Mov Disord* 7 (1):2-13. doi:10.1002/mds.870070103
36. Goetz CG, Stebbins GT, Shale HM, Lang AE, Chernik DA, Chmura TA, Ahlskog JE, Dorflinger EE (1994) Utility of an objective dyskinesia rating scale for Parkinson's disease: inter- and intrarater reliability assessment. *Mov Disord* 9 (4):390-394. doi:10.1002/mds.870090403
37. Lanciego JL, Vazquez A (2012) The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections. *Brain Struct Funct* 217 (2):613-666. doi:10.1007/s00429-011-0370-5
38. Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, Canela EI, 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 (3):343-354. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.05.010
39. Casado V, Ferrada C, Bonaventura J, Gracia E, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Cortes A, Franco R (2009) Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. *Biochem Pharmacol* 78 (12):1456-1463. doi:10.1016/j.bcp.2009.07.012
40. Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, Ciruela F, Lluís C, Canela EI (2006) The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. *Mol Pharmacol* 69 (6):1905-1912. doi:10.1124/mol.105.020685
41. Casado V, Canti C, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R (1990) Solubilization of A1 adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J Neurosci Res* 26 (4):461-473. doi:10.1002/jnr.490260409
42. Soderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, Landegren U (2008) Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* 45 (3):227-232. doi:10.1016/j.ymeth.2008.06.014
43. Trifilieff P, Rives ML, Urizar E, Piskorowski RA, Vishwasrao HD, Castrillon J, Schmauss C, Slattman M, Gullberg M, Javitch JA (2011) Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 51 (2):111-118. doi:10.2144/000113719
44. Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepulveda M, Navarro G, Casado V, Cortes A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Moratalla R, Ferre S, Ortiz J, Franco R (2011) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem* 286 (7):5846-5854. doi:10.1074/jbc.M110.161489
45. Gonzalez S, Moreno-Delgado D, Moreno E, Perez-Capote K, Franco R, Mallol J, Cortes A, Casado V, Lluís C, Ortiz J, Ferre S, Canela E, McCormick PJ (2012) Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D(4) receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLoS Biol* 10 (6):e1001347. doi:10.1371/journal.pbio.1001347
46. Guigoni C, Aubert I, Li Q, Gurevich VV, Benovic JL, Ferry S, Mach U, Stark H, Leriche L, Hakansson K, Bioulac BH, Gross CE, Sokoloff P, Fisone G, Gurevich EV, Bloch B, Bezard E (2005) Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S25-29. doi:10.1016/j.parkreldis.2004.11.005
47. Schneider LH, Murphy RB, Coons EE (1982) Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats. *Neurosci Lett* 33 (3):281-284

48. Navarro G, Ferre S, Cordomi A, Moreno E, Mallol J, Casado V, Cortes A, Hoffmann H, Ortiz J, Canela EI, Lluís C, Pardo L, Franco R, Woods AS (2010) Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. *J Biol Chem* 285 (35):27346-27359. doi:10.1074/jbc.M110.115634
49. Silva MA, Topic B, Lamounier-Zepter V, Huston JP, Tomaz C, Barros M (2007) Evidence for hemispheric specialization in the marmoset (*Callithrix penicillata*) based on lateralization of behavioral/neurochemical correlations. *Brain Res Bull* 74 (6):416-428. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.07.012
50. Frasnelli E (2013) Brain and behavioral lateralization in invertebrates. *Front Psychol* 4:939. doi:10.3389/fpsyg.2013.00939
51. Gracia E, Farre D, Cortes A, Ferrer-Costa C, Orozco M, Mallol J, Lluís C, Canela EI, McCormick PJ, Franco R, Fanelli F, Casado V (2013) The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J* 27 (3):1048-1061. doi:10.1096/fj.12-212621
52. Ferre S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pflieger KD, Pin JP, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS, Franco R (2009) Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol* 5 (3):131-134. doi:10.1038/nchembio0309-131
53. Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111 (2):219-230
54. Fiorentini C, Gardoni F, Spano P, Di Luca M, Missale C (2003) Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 278 (22):20196-20202. doi:10.1074/jbc.M213140200
55. Fiorentini C, Busi C, Spano P, Missale C (2008) Role of receptor heterodimers in the development of L-dopa-induced dyskinesias in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2:S159-164. doi:10.1016/j.parkreldis.2008.04.022
56. Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 57 (1):17-26. doi:10.1002/ana.20296
57. Lebel M, Chagniel L, Bureau G, Cyr M (2010) Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiol Dis* 38 (1):59-67. doi:10.1016/j.nbd.2009.12.027
58. Picconi B, Centonze D, Hakansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, Cenci MA, Calabresi P (2003) Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci* 6 (5):501-506. doi:10.1038/nn1040
59. Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Herve D, Greengard P, Fisone G (2007) Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci* 27 (26):6995-7005. doi:10.1523/JNEUROSCI.0852-07.2007
60. Santini E, Sgambato-Faure V, Li Q, Savasta M, Dovero S, Fisone G, Bezard E (2010) Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia. *PLoS One* 5 (8):e12322. doi:10.1371/journal.pone.0012322

Table 1. Parameters for SKF-38393 binding to D₁ receptors in the absence and presence of a D₃-receptor-selective agonist (PIPAT). Data were fitted to the two-state dimer model as indicated in Methods. Values are mean ± SEM (n=3). Two-way ANOVA showed significant inter-group differences (p<0.001) on K_{DB1} and K_{DB2} in samples from the right hemisphere.

| Competition experiments [³ H]SCH-23390 vs SKF-38393 | Parameters | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Right side | | Left side | |
| | K _{DB1} (nM) | K _{DB2} (nM) | K _{DB1} (nM) | K _{DB2} (nM) |
| Naïve | 22±2 | 370±40 | 3±1 | 80±10 |
| + 7-OH-PIPAT (100nM) | 21±6 | 330±50 | 6±2 | 120±30 |
| Lesioned | 28±3 | 450±20 | 3±1 | 120±20 |
| + 7-OH-PIPAT (100nM) | 22±3 | 470±40 | 7±3 | 210±40 |
| Lesioned + L-DOPA-treated | 20±2 | 330±30 | 2±1 | 60±20 |
| + 7-OH-PIPAT (100nM) | 28±2 | 270±30 | 8±3 | 90±20 |
| Dyskinetic (L-DOPA-induced) | 20±2 | 340±30 | 4±1 | 160±30 |
| + 7-OH-PIPAT (100nM) | 5±1* | 160±30** | 4±1 | 160±20 |

* p<0.05 and ** p<0.01 respect to naïve after Bonferroni's post-hoc test.

Figure Legends (please download high quality images)

Figure 1. D₁ (D₁R) and D₃ (D₃R) receptor expression in the rat striatum.

Maximum binding to right and left hemi-striatal membranes from non-lesioned (naïve), lesioned (parkinsonian) and L-DOPA-treated rats displaying dyskinesia (dyskinetic) was calculated by radioligand binding saturation experiments. Radioligand binding was performed with increasing concentrations of either the D₁ receptor antagonist [³H]SCH-23390 or the D₃ receptor agonist [³H] 7-OH-DPAT ligand (4 nM, B) in competition with increasing concentrations of the same non-radiolabeled ligand. Maximum binding ($B_{max}=2R_T$) was obtained by fitting saturation binding data to eq. 1. Values represent the mean \pm SEM of n = 3. Two-way ANOVA analysis showed significant inter-group differences ($p<0.0010$) on Bmax values for D₃ receptors.

* $p<0.05$ and *** $p<0.001$ (respect to naïve); # $p<0.05$ (respect to right hemisphere) after Bonferroni's post-hoc test.

Immunohistochemistry for D₃ receptors was performed in rat striatal sections from naïve (C) and dyskinetic (D) animals as described in Methods. Scale bar: 20 μ M

Figure 2. D₁-D₃ receptor heteromer expression in the rat striatum. *In situ* proximity ligation assays were performed as described in Materials and Methods using right and left hemistriatal sections from non-lesioned (A, E) or lesioned (B) rats as well as L-DOPA-treated lesioned rats not displaying (C) or displaying (D) high dyskinesia. Confocal microscopy images (superimposed sections) are shown; heteromers appear as red clusters surrounding DAPI-stained nuclei in blue. In (F), the ratio r (number of red spots/cell-containing spots) for the indicated samples is expressed. The number of cells containing one or more red spots (expressed in percentage of the total number of cells) is shown above bars. Data (ratio or percentage of positive cells) are the mean \pm SEM of counts in 5-7 different fields from 3 different animals. Two-way ANOVA analysis showed significant inter-group differences ($p<0.001$) on ratio and percentage of positive cells.

** $p<0.01$ (respect to naïve); ### $p<0.001$ (respect to negative control) after Bonferroni's post-hoc test.

Scale bars: 20 μ M

Figure 3. D₁-D₃ receptor heteromer expression in monkey striatum.

In situ proximity ligation assays were performed as described in Materials and Methods using caudate (A-D and A'-D') and putamen (E-H and E'-H') sections from *Macaca fascicularis*, untreated, treated with MPTP and treated with MPTP and rendered dyskinetic by chronic L-

DOPA administration. A'-D' and E'-H' are magnification images of fields (white-dotted rectangles) in, respectively, A-D and E-H. C. In (A, A', E, E') negative controls were performed using only D₁ receptor antibody as primary antibodies. Confocal microscopy images (superimposed sections) are shown; heteromers appear as red clusters surrounding DAPI-stained nuclei in blue. Scale bar: A-H= 20 μm; A'-H' 5 μm. In (I), the ratio *r* (number of red spots/cells containing spots) for the indicated samples is expressed. The number of cells containing one or more red spots (expressed in percentage of the total number of cells) is shown above bars. Data (ratio or percentage of positive cells) are the mean ± SEM of counts in 5-9 different fields from different animals. Two-way ANOVA analysis showed significant inter-group differences ($p < 0.001$) on ratio and percentage of positive cells.

*** $p < 0.001$ (respect to control macaque); ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (respect to negative control) after Bonferroni's post-hoc test.

Figure 4. D₁-D₃ receptor cross-talk detected by radioligand binding

Competition by SKF-38393 of [³H]SCH-23390 binding to right striatal membranes from naïve (A) and dyskinetic (B) animals in the absence or presence of 100 nM PIPAT, a D₃ receptor agonist.

Figure 5. Scheme of the role of D₁-D₃ receptor heteromers in L-DOPA-induced dyskinesia.

Indirect D₂-receptor-expressing and direct-D₁-receptor expressing striatal projecting neurons are altered after dopamine depletion in Parkinson's disease and by therapy with L-DOPA. The strength of dopaminergic signaling via D₁ and D₂ receptors is differentially unbalanced in dyskinetic animals. In the particular case of the direct pathway, sensitization of D₁ receptors and right/left balancing occurs via increased expression of D₁-D₃ receptor heteromers.

Figure 1

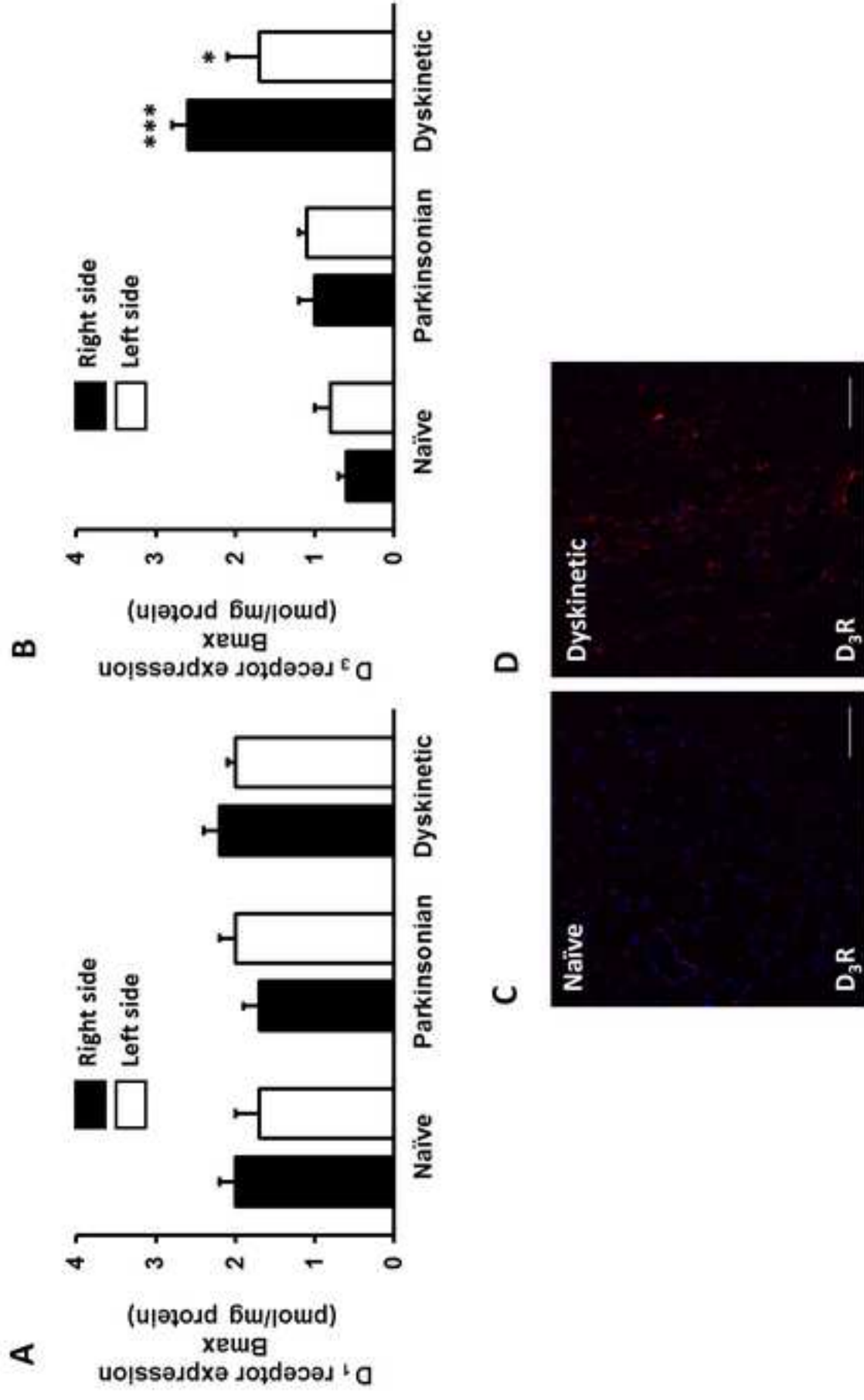


Figure 2

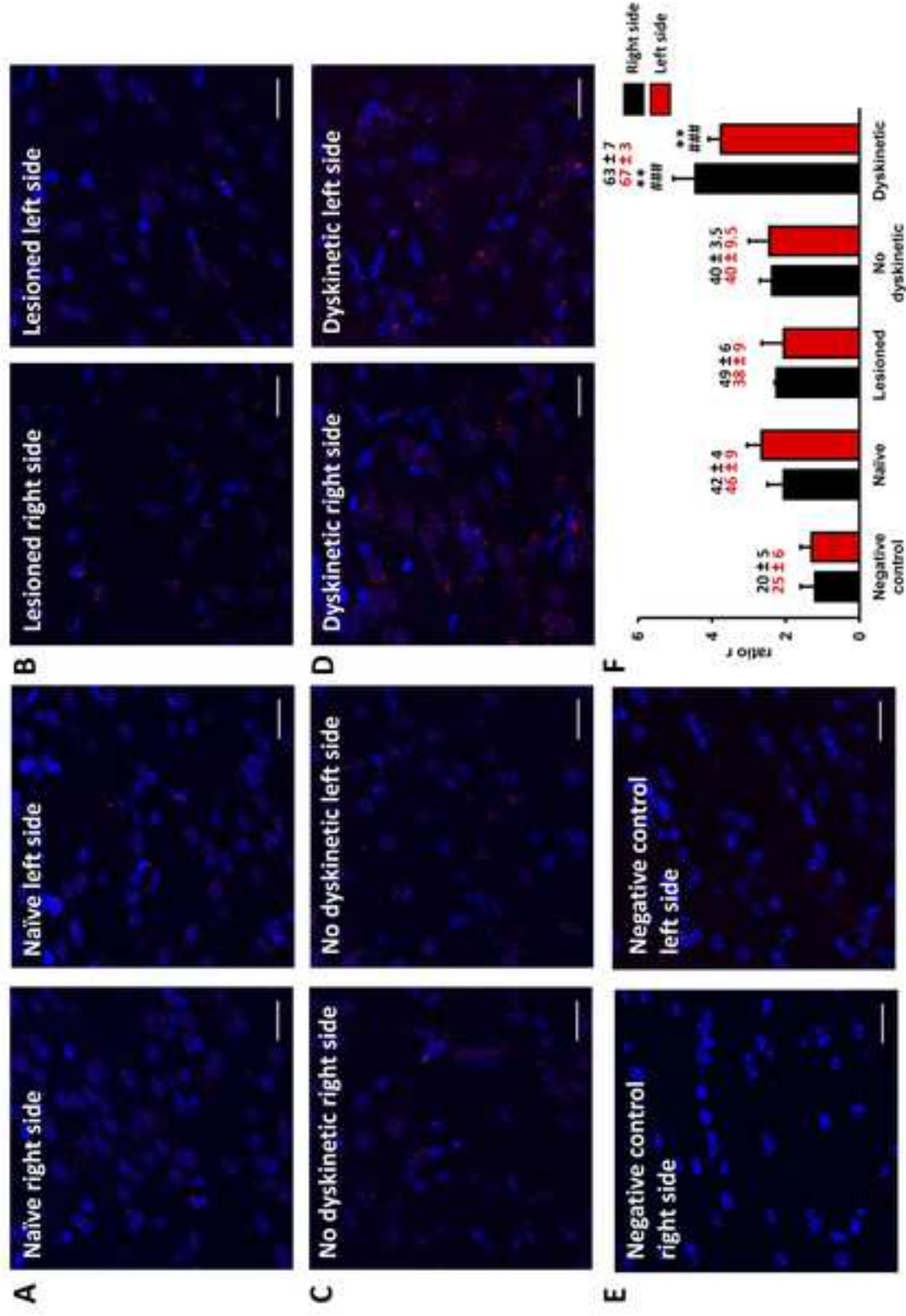


Figure 3

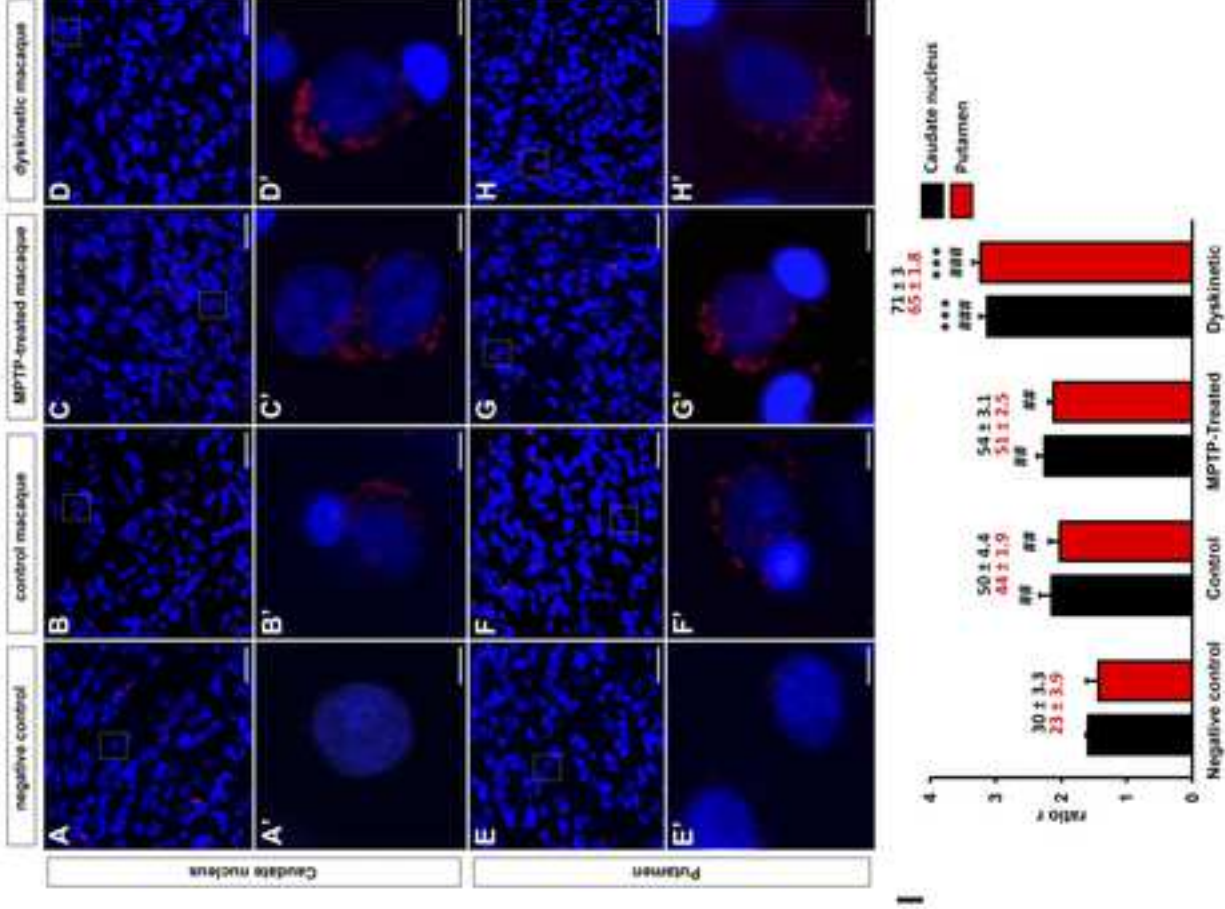
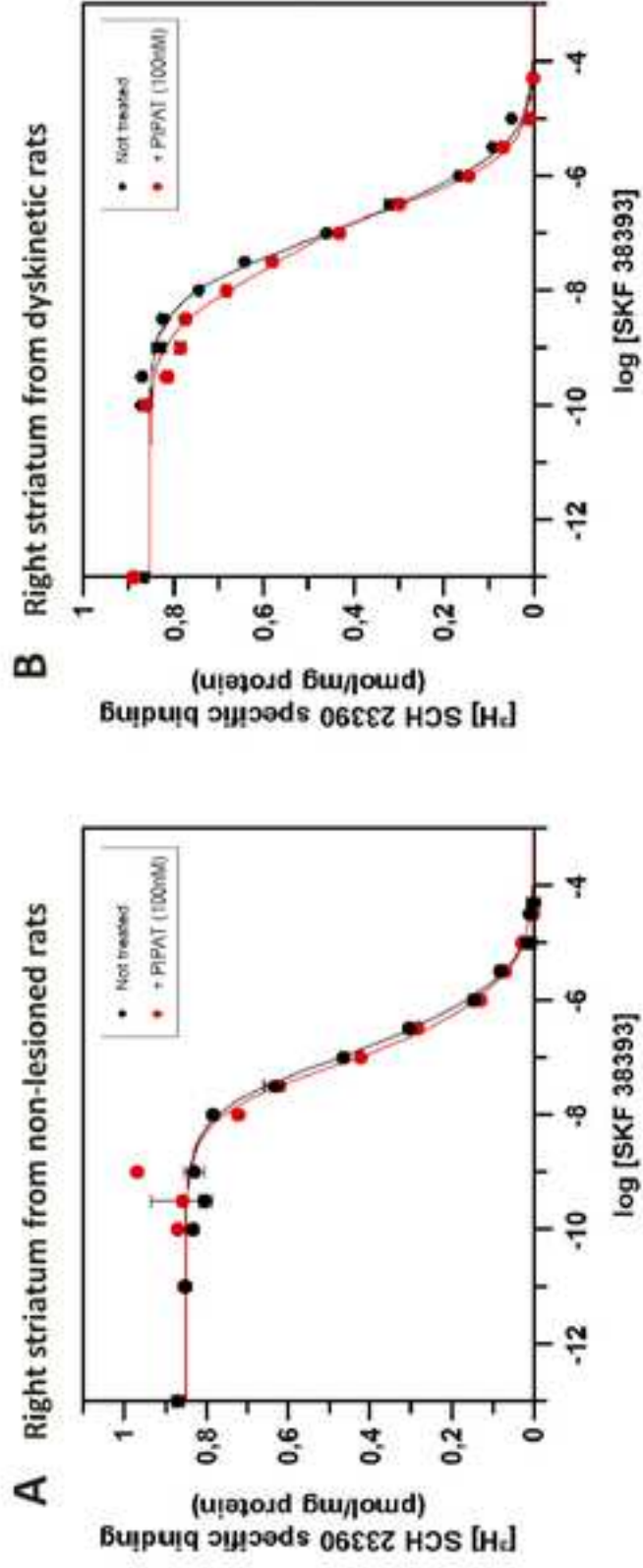
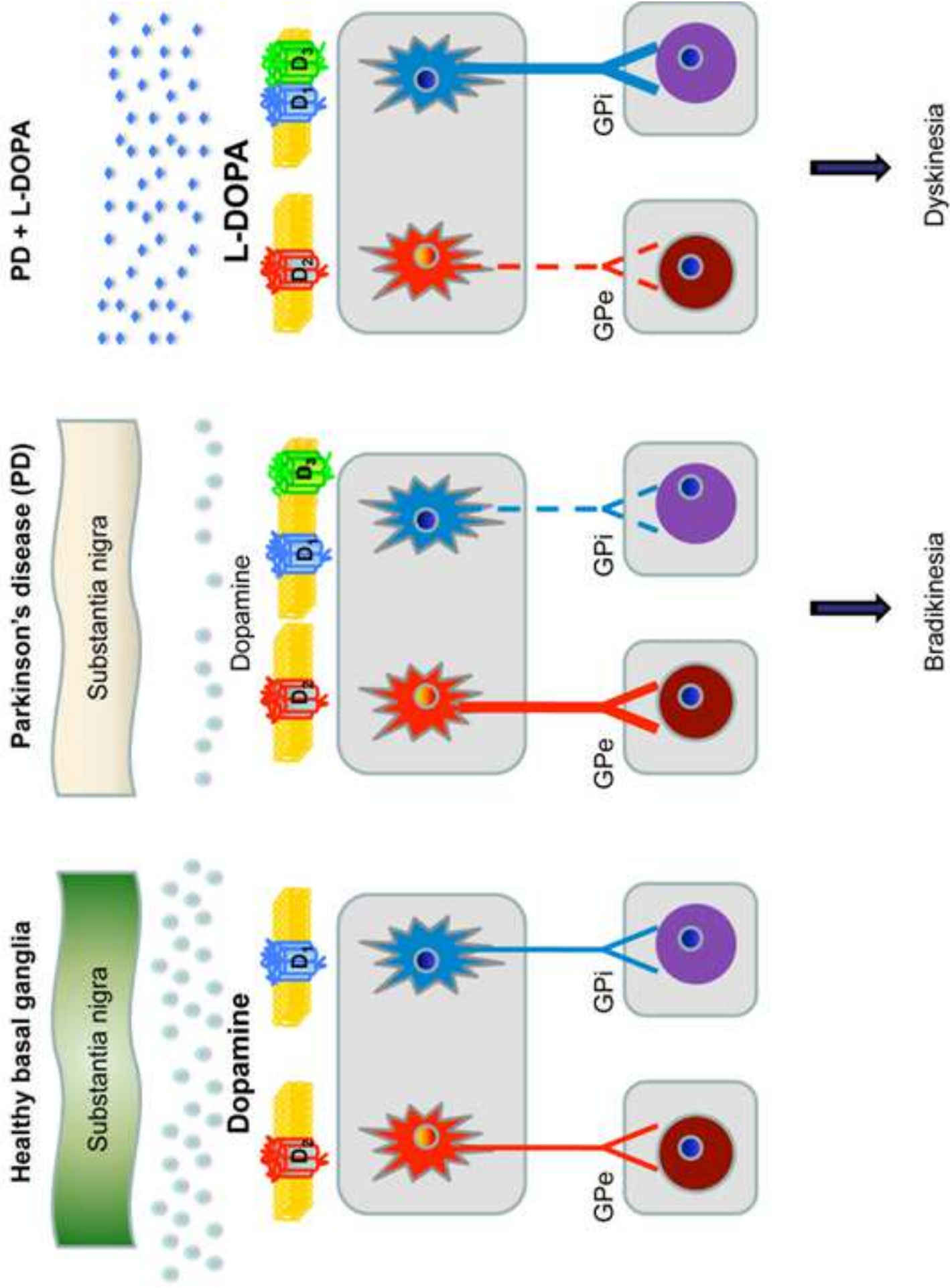


Figure 4



Figure_5
[Click here to download high resolution image](#)



Rafael Franco Fernández y Vicent Casadó Burillo
Grupo de Neurobiología Molecular
Dep. de Bioquímica y Biología Molecular
Av. Diagonal, 643
Edificio Prevosti, planta -2
08028 Barcelona

La Tesis doctoral de Daniel Farré Pérez “*Heterómeros de receptores de dopamina como dianas terapéuticas en la enfermedad de Parkinson y en discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA*” se presenta como compendio de publicaciones.

En el apartado de RESULTADOS se presentan los siguientes manuscritos:

El manuscrito “**The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors**” ha sido publicado en *The FASEB Journal* con un factor de impacto de 5,480 (Q1).

El trabajo “**Cocaine inhibits dopamine D₂ receptor signaling via sigma-1-D₂ receptor heteromers**” ha sido publicado en *PLoS One* con un factor de impacto de 3,534 (Q1).

El manuscrito “**L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine–CB₁ cannabinoid–D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus**” ha sido publicado en *Neuropharmacology* con un factor de impacto de 4,819 (Q1).

El manuscrito “**L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}–cannabinoid CB₁–dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies**” ha sido publicado en *Experimental Neurology* con un factor de impacto de 4,617 (Q1).

El trabajo “**Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia**” ha sido enviado para su publicación a la revista *Molecular Neurobiology* con un factor de impacto 5,286 (Q1).

En el manuscrito “**The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors**” el doctorando Daniel Farré ha realizado los experimentos de unión de radioligandos, de determinación

de la actividad enzimática y de *western-blot* en colaboración con Eduardo Gracia. En el trabajo **“Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D₂ receptor heteromers”**, ha realizado parte de los experimentos de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente entre los diferentes receptores de dopamina *D₂-like* y sigma-1. En los artículos **“L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine–CB₁ cannabinoid–D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus”** y **“L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}–cannabinoid CB₁–dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies”**, el doctorando Daniel Farré ha realizado parte de de los experimentos de unión de radioligandos en colaboración con Jordi Bonaventura. En el trabajo **“Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia”**, el doctorando Daniel Farré ha realizado la totalidad de los experimentos de unión de radioligandos, y parte de los experimentos de PLA en colaboración con Estefanía Moreno.

Barcelona, a día 15 de Septiembre de 2014

Dr. Rafael Franco Fernández

Dr. Vicent Casadó Burillo

**RESUMEN DE RESULTADOS
Y DISCUSIÓN**

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un modelo ampliamente aceptado de la función de los ganglios basales propone que la estimulación de las vías estriatales eferentes directa e indirecta da como resultado la activación o inhibición motora, respectivamente (Albin *et al.* 1989; DeLong 1990) y que el correcto funcionamiento motor depende de la influencia balanceada de estas vías en la actividad neuronal de las estructuras de salida de los ganglios basales (Kravitz *et al.* 2010). En la enfermedad de Parkinson este equilibrio en los circuitos de los ganglios basales se pierde debido a una depleción de dopamina en el estriado causada por la degeneración de las neuronas nigroestriatales dopaminérgicas (Lewis *et al.* 2003; Obeso *et al.* 2008). A medida que avanza el proceso degenerativo, la terapia de reposición se hace necesaria para ayudar a aliviar la disfunción motora. La levodopa (L-DOPA) es aún el agente más efectivo para mejorar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson, ya que actúa como una fuente de dopamina al cerebro capaz de interactuar con los receptores de dopamina de las familias D_1 -like y D_2 -like (Encarnación y Hauser 2008), pero su uso crónico está asociado con la emergencia de complicaciones motoras que incluyen la fluctuación de respuesta y las discinesias (Bezard *et al.* 2001). Aunque los mecanismos que conducen a las complicaciones motoras no están totalmente elucidados, la discinesia inducida por L-DOPA se cree que es el resultado de los efectos combinados del daño dopaminérgico nigroestriatal y del tratamiento pulsátil con L-DOPA (Obeso *et al.* 2000; Cenci *et al.* 2007), y por tanto se ha realizado un gran esfuerzo para encontrar nuevos compuestos que permitan la sustitución de los actuales.

El desarrollo de compuestos no dopaminérgicos para ser utilizados en terapias basadas en L-DOPA ha sido objeto de mucho interés en los últimos años (Pinna *et al.* 2009; Gottwald y Aminoff 2011). Entre las nuevas clases de fármacos, los antagonistas del receptor A_{2A} de adenosina han surgido como los mejores candidatos, ya que se considera que ejercen una acción facilitadora de la transmisión dopaminérgica que puede resultar en una activación motora, a través de interacciones tanto con el receptor D_1 (Pinna *et al.* 1996; Pollack *et al.* 1996;) como con el receptor D_2 (Ferré *et al.* 1991; Ferré y Fuxe 1992; Ferré *et al.* 2004; Schwarzschild *et al.* 2006; Müller y Ferré 2007; Pinna 2009). Otro de los receptores involucrados en las alteraciones motoras en la enfermedad de Parkinson son los receptores de cannabinoides. En muestras de pacientes o de animales modelo de la patología se ha demostrado que el sistema

endocannabinoide está sobreactivado en los estadios avanzados de la enfermedad pero paradójicamente, las primeras fases de la enfermedad de Parkinson están asociadas a una regulación a la baja de los receptores CB₁ (Sagredo *et al.* 2007), que podrían incluso servir como un biomarcador en la fase inicial de la enfermedad. Diferentes hallazgos refuerzan la teoría que el bloqueo de los receptores de CB₁ podría ser útil contra la bradicinesia parkinsoniana (García-Arencibia *et al.* 2009; Orgado *et al.* 2009). Utilizando una técnica basada en la transferencia de energía por resonancia (Carriba *et al.* 2008), nuestro grupo ha demostrado recientemente que los receptores CB₁ pueden formar heterómeros con los receptores A_{2A} de adenosina y D₂ de dopamina, en células transfectadas y estriado de ratón (Navarro *et al.* 2010).

Considerando esto, hemos querido estudiar la expresión y la función de los heterómeros A_{2A}-CB₁-D₂ en el estriado de modelos primates y murinos de la enfermedad de Parkinson, para investigar si este heterotrímero es una diana real para ser tomada en cuenta en el diseño de terapias antidiscinéticas. Los resultados de este primer objetivo de la Tesis ha dado lugar a dos manuscritos: por una parte, respecto al estudio en el modelo del primate *Macaca fascicularis*, a la publicación **L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A_{2A} adenosine-CB₁ cannabinoid-D₂ dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus**; posteriormente, y en relación a la investigación con ratas, al artículo **L-DOPA disrupts adenosine A_{2A}-cannabinoid CB₁-dopamine D₂ receptor heteromer cross-talk in the striatum of hemiparkinsonian rats: Biochemical and behavioral studies**.

En primer lugar, se comenzó la investigación de la expresión del heterotrímero en el estriado de macacos de la especie *Macaca fascicularis*, ya que una ventaja del estriado de los primates es la posibilidad de delinear mejor las diferentes regiones del estriado. Empleando la técnica de los ensayos *in situ* de ligación por proximidad (PLA), que permite la determinación de interacciones moleculares entre dos proteínas diferentes, detectamos heterómeros A_{2A}-CB₁, A_{2A}-D₂ y CB₁-D₂ en alto porcentaje de células de caudado de macaco con una tinción relativamente alta. La detección de heterómeros de cada pareja de A_{2A}, CB₁ y D₂ en cantidades similares sugiere la expresión del heterómero A_{2A}-CB₁-D₂ en el caudado de macaco. En contraste y sorprendentemente, cuando se estudian los cortes de putamen del primate la señal positiva de PLA correspondiente a las parejas de heterómeros estudiadas anteriormente,

se ve muy disminuida, tanto en número de células marcadas como en la intensidad de la señal, indicando que los heterómeros A_{2A} - CB_1 - D_2 no se expresan en el putamen pre y post-comisural de *Macaca fascicularis*. Para obtener más pruebas de la expresión de los heterómeros de receptores A_{2A} - CB_1 - D_2 en el estriado de macacos y de su funcionalidad, investigamos el *cross-talk* a nivel de unión de ligandos entre los receptores A_{2A} , CB_1 y D_2 usando membranas de caudado y putamen de macacos. Se realizaron experimentos de competición para calcular las constantes de afinidad por la unión de la dopamina a los receptores D_2 en las diferentes condiciones heteroméricas. De estos ensayos en caudado, obtuvimos que no sólo el agonista del receptor A_{2A} sino que también el agonista de CB_1 inducen un descenso de más de tres veces en la afinidad de la dopamina por los receptores D_2 , y que este efecto se revierte cuando están presentes simultáneamente ambos agonistas. Estos resultados pueden explicarse por una interacción molecular receptor-receptor entre los receptores del heterómero A_{2A} - CB_1 - D_2 donde la unión del agonista a uno de los receptores induce un cambio conformacional que afecta a los otros receptores del heterómero. En el putamen, la afinidad de la dopamina por los receptores D_2 no se ve modificada, y estos resultados junto a la escasa expresión del heterómero observada en los experimentos de PLA indican que solamente en el caudado, pero no en el putamen, la unión de la dopamina a los receptores D_2 se ve modulada por la activación individual de CB_1 o de A_{2A} pero que la coactivación de ambos receptores bloquea esta modulación negativa. Es importante destacar que los cambios en la heteromerización en putamen respecto al caudado no son debidos a la pérdida de expresión de los receptores.

Teniendo en cuenta que los heterómeros A_{2A} - CB_1 - D_2 se expresan en el caudado de macacos, se ha hipotetizó que este complejo pudiera tener un papel o estar alterado en la enfermedad de Parkinson, y así servir como una diana potencial en la terapia. Teniendo en cuenta esta hipótesis, se investigó la expresión de los heterotrímeros en cortes de caudado de macacos lesionados con MPTP, mediante el uso de la PLA. Así, se detectaron las parejas de heterómeros A_{2A} - CB_1 , A_{2A} - D_2 y CB_1 - D_2 en un porcentaje de células y con un nivel de señal que no es significativamente diferente de los macacos control. Estos resultados sugieren que la expresión del heterómero A_{2A} - CB_1 - D_2 también se da en el caudado de animales parkinsonianos. De manera similar a lo observado en los animales no lesionados, tanto el agonista de A_{2A} como el del receptor CB_1 provocaron un descenso en la afinidad de la dopamina por los receptores D_2 del

caudado, y este efecto se veía revertido cuando ambos ligandos se añadían simultáneamente. Las constantes de afinidad no se modificaban en muestras de putamen pre y post-comisural. El hecho que se observe un comportamiento similar en la unión de ligandos al heterotrímero A_{2A} - CB_1 - D_2 en monos control y parkinsonianos indica que la lesión no cambia la función del heterómero, y que, por lo tanto, el heterómero podría ser una diana real en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Para reforzar la hipótesis anterior, probamos otro modelo animal de la enfermedad de Parkinson: las ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA (6-hidroxidopamina). En las ratas control o en los estriados hemi-no lesionados, tanto el agonista de A_{2A} como el del receptor CB_1 inducen un descenso en la afinidad de la dopamina por los receptores D_2 , un efecto que se ve parcialmente revertido cuando los dos agonistas se añaden al mismo tiempo. Se obtienen resultados similares en las membranas hemi-estriatales del lado lesionado con 6-OHDA, excepto que el descenso en la afinidad no se ve revertido con la adición simultánea de los agonistas de los receptores A_{2A} y CB_1 . Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos con macacos, reforzando la idea que los heterómeros de receptores A_{2A} - CB_1 - D_2 pueden ser una diana real para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En la enfermedad de Parkinson, la terapia de reposición de la dopamina con la L-DOPA, sigue siendo aún la más efectiva para mejorar la hipocinesia asociada a la enfermedad, pero su uso crónico está asociado a complicaciones motoras que incluyen las discinesias (Obeso *et al.* 2010). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento, nos preguntamos si estas discinesias están asociadas a cambios en la función de los heterómeros de receptores A_{2A} - CB_1 - D_2 . Con tal de responder a esa pregunta, usamos cortes de caudado de macacos discinéticos inducidos con L-DOPA y se testó la expresión del heterotrímero con la PLA. En las muestras de caudado de monos discinéticos encontramos unos niveles de expresión de las parejas de heterómeros A_{2A} - CB_1 , A_{2A} - D_2 y CB_1 - D_2 drásticamente disminuidos en comparación a los animales controles. Por lo tanto, parece que la condición de la discinesia bloquea la formación del heterotrímero. Para corroborarlo realizamos experimentos de *cross-talk* a nivel de unión de ligandos. De manera interesante, en estas condiciones de discinesia, la afinidad en caudado de la dopamina por el receptor D_2 no se vio modificada por la presencia de agonistas de los otros dos receptores, indicándose una pérdida del *cross-talk* funcional

entre receptores que se corresponde con la pérdida de formación de heterómeros detectada por PLA. Los cambios en la heteromerización en los macacos discinéticos no son debidos a cambios en los niveles de expresión relativa entre los animales no lesionados, lesionados con MPTP y los discinéticos, ya que la expresión de los tres receptores es similar. En el putamen pre y post-comisural de los monos discinéticos, la falta de heteromerización entre receptores concuerda con el hecho de que la afinidad por la dopamina no se ve afectada por la unión de agonistas de A_{2A} y CB_1 .

Paralelamente investigamos si esta pérdida del *cross-talk* entre receptores inducida por la L-DOPA en macacos se puede observar también en otro modelo animal de la enfermedad, por lo que empleamos ratas lesionadas con 6-OHDA y tratadas aguda o crónicamente con L-DOPA. En estas muestras, el descenso de la afinidad de la dopamina por los receptores D_2 inducida por los agonistas de A_{2A} y de CB_1 solos o combinados, que se veía en los animales control o lesionados con 6-OHDA, se mostró muy reducida en las membranas del lado lesionado y no lesionado de las ratas tratadas con L-DOPA, sugiriendo que este efecto puede ser debido a tratamiento con L-DOPA más que a la lesión. De nuevo es importante remarcar, que el nivel de expresión de los receptores es similar en todos los casos. Globalmente, estos resultados son muy similares a los obtenidos en macacos, indicando que la pérdida de *cross-talk* funcional entre los receptores se observa en diferentes modelos animales discinéticos.

La ADA (adenosina aminohidrolasa/desaminasa) es un enzima que cataliza la desaminación hidrolítica de la adenosina y de la 2'-desoxiadenosina a inosina y 2'-desoxiinosina, respectivamente. En 1993, Kameoka y colaboradores identificaron el CD26 como una proteína de anclaje extracelular de ADA. Posteriormente, el grupo de investigación en el cual se ha desarrollado esta Tesis doctoral descubrió otras proteínas de anclaje de ecto-ADA: el receptor de adenosina del subtipo A_1 (Ciruela *et al.* 1996; Saura *et al.* 1996) y del tipo A_{2A} (Gracia *et al.* 2011) y A_{2B} (Herrera *et al.* 2001). Las interacciones moleculares entre las diferentes proteínas, la ADA y los receptores de adenosina descritos, se producen incluso cuando el enzima carece de actividad desaminasa. Desde un punto de vista funcional, las interacciones enzima-receptor son importantes ya que de este modo la ADA regularía la transducción de señal producida por el receptor y modularía su proceso de desensibilización, además de facilitar la unión

unión de ligandos al receptor de adenosina A₁ y A_{2A} (Saura *et al.* 1996; Sun *et al.* 2005; Gracia *et al.* 2008; Gracia *et al.* 2011).

Además de los complejos binarios ADA-receptores de adenosina A₁, A_{2A} y A_{2B}, estudiados en nuestro grupo (Herrera *et al.* 2001; Gracia *et al.* 2008; Gracia *et al.* 2011), se han descritos agregados proteicos de orden superior formados por ADA y los receptores de adenosina. En este sentido, Torvinen y colaboradores (2000) hipotetizaron la existencia de complejos heteroméricos funcionales en neuronas corticales formados por la ADA, los receptores A₁ de adenosina y los receptores D₁ de dopamina, y que estos agregados son modulables por la dopamina y la adenosina. Por otra parte, Pacheco y colaboradores (2005) han mostrado que la ADA anclada a la membrana de células dendríticas, probablemente a través del receptor A_{2A}, interacciona con CD26 expresado en la superficie de células T. En este caso, se ha propuesto que la ADA actúa como puente entre células dendríticas y linfocitos en la inmunosinapsis, desencadenando la coestimulación de estas células. Esta señal coestimuladora promueve la proliferación de células T con un patrón Th1 y la producción de citocinas proinflamatorias, con lo que se incrementa la respuesta inmune (Climent *et al.* 2009; Martinez-Navio *et al.*, 2009).

Aunque los contactos intermoleculares que contribuyen y estabilizan la formación del complejo ADA-CD26 son conocidos, los dominios de la ADA involucrados en la interacción con los receptores de adenosina no han sido estudiados. Por ello, el objetivo segundo de la presente Tesis doctoral, desarrollado en el trabajo “*The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors*”, ha sido caracterizar los dominios moleculares de la ADA involucrados en la modulación de su actividad catalítica y en la interacción con los receptores A₁ y A_{2A}, previamente demostrados por nosotros en los trabajos anteriores.

Para este propósito, seleccionamos algunas secuencias aminoacídicas de la ADA, que podrían contribuir de forma significativa en la interacción con ambos receptores de adenosina, basándonos en estudios de *docking*. Estos estudios sugieren una tendencia significativa de cada uno de los monómeros del enzima a interactuar con cada uno de los receptores de A_{2A} adenosina. Los segmentos de la secuencia aminoacídica seleccionados fueron: segmento 1 Leu58-Met69; segmento 2 Pro114-

Asn118; segmento 3 Met155-Gln158; segmento 4 Gly184-Ile188. De estos cuatro segmentos, el segmento 1 aporta la contribución más importante a la interacción entre las dos proteínas.

También analizamos a través de estudios de dinámica molecular la estructura de la ADA. Tales estudios muestran claramente dos estados del enzima: uno en forma abierta y otro en forma cerrada. La principal diferencia entre estos dos estados es un cambio en la conformación de una hélice α (residuos Leu58-Iso72) y un bucle (residuos Leu182-Asp185) en la zona de la catálisis. En el estado de la forma abierta estos residuos se encuentran en una conformación más laxa, permitiendo la entrada y salida del ligando. Por el contrario, en el estado de la forma cerrada estos se encuentran más rígidos impidiendo el movimiento del ligando.

Estos estados conformacionales corresponden a las formas abierta y cerrada previamente detectadas en diversos estudios (Wilson *et al.* 1991; Wilson y Quioco, 1993; Wang y Quioco, 1998; Kinoshita *et al.* 2005). Se comprobaron las distancias al ligando y las energías de interacción en todas las trayectorias posibles y finalmente obtuvimos una serie de residuos supuestamente involucrados en la interacción. Además, el Área de Desolvatación Óptima (*Optimal Desolvation Area*, ODA) es una de las fuerzas motrices involucradas en las interacciones proteína-proteína, utilizamos este tipo de cálculos con el fin de averiguar las regiones potencialmente implicadas en las interacciones enzima-receptor. Analizamos las regiones de ODA durante todo el tiempo de la simulación, para las formas abierta y cerrada, y encontramos dos regiones coincidentes con las determinadas por las energías de unión y distancia del ligando. La combinación de estos análisis nos proporcionó una lista de residuos relacionados con la unión de ligando y con la interacción proteína-proteína. Algunos de estos residuos están incluidos en tres de las cuatro regiones deducidas por los estudios de *docking* y fueron considerados para ser mutados.

Como consecuencia de todo ello, diseñamos una serie de mutaciones representativas que cubren los segmentos supuestamente involucrados en la interacción de la ADA con los receptores de adenosina deducidos por los estudios de *docking* y de dinámica molecular. Para ello utilizamos la técnica de mutagénesis sistemática a alanina, con el objetivo de analizar el efecto de las mutaciones sobre la eficiencia

catalítica de la ADA y sobre los incrementos inducidos por el enzima en la unión de agonistas a los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} . Las mutaciones sobre la ADA incluyeron sustituciones a alanina para los aminoácidos Leu-58, Asp-60, Phe-61, Leu-62, Lys-64, Phe-65, Asp-66, Met-69, Ile-115, Asn-118, Met-155, His-157, Asp-185, Leu-194 y la mutación del residuo Gly-184 a glutamina (Gln). Las mutaciones fueron generadas por mutagénesis dirigida directamente en el plásmido pZC11 que contenía el cDNA de la ADA humana. Los mutantes fueron expresados en una cepa deficiente en ADA bajo condiciones estandarizadas. Para investigar los epítomos de la ADA involucrados en la interacción con los receptores de adenosina, se utilizaron preparaciones de los enzimas *wild-type* y mutado, purificados parcialmente.

La actividad específica de varios mutantes de la ADA resultaron claramente diferentes a los valores obtenidos con el enzima *wild-type*. Este hecho sugiere la existencia de cambios en la eficiencia catalítica de la ADA debido a modificaciones en los parámetros cinéticos del enzima. Para examinar el efecto de las mutaciones en el comportamiento catalítico de la ADA, los parámetros de los enzimas mutados y *wild-type* fueron determinados utilizando adenosina como sustrato. Los valores de K_M , k_{cat} , y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) del enzima recombinante y de los mutantes fueron determinados. Adicionalmente, para comprobar el efecto en la conservación de la estructura del centro activo, las constantes de afinidad para el inhibidor del estado basal, ribósido de purina ($K_{i(PR)}$), también fueron determinadas.

Obtuvimos parámetros muy similares al enzima *wild-type* para los mutantes Asp66Ala, Ile155Ala y Leu194Ala, y detectamos pequeñas diferencias en algunos de los parámetros cinéticos para los mutantes Asp60Ala, Lys64Ala, Asn118Ala, His157Ala, Gly184Ala y Asp185Ala. Las mutaciones en los aminoácidos Phe61, Met69, Met155 y Phe65, causaron una disminución de un orden de magnitud en la eficiencia catalítica. Las mutaciones en los aminoácidos Phe61 y Met69 disminuyeron la eficiencia catalítica debido a una disminución en el valor de k_{cat} , pero no en el valor de K_M , hecho que indica que estas mutaciones son importantes para alcanzar la V_{max} . Las mutaciones en los aminoácidos Met155 y Phe65, alteraron los valores de k_{cat} y de K_M , hecho que indica que el valor de V_{max} y la afinidad del sustrato fueron disminuidas. Por último, las mayores alteraciones observadas en los valores de k_{cat} y de K_M se detectaron en los mutantes Leu58Ala y Leu62Ala, dando lugar a una disminución de

dos órdenes de magnitud en la eficiencia catalítica. Para estos dos últimos mutantes, se detectaron cambios en ambos valores de k_{cat} y de K_M , indicando que tanto la afinidad para el sustrato como la velocidad máxima fueron disminuidas, lo que sugiere que estas mutaciones alteran la estructura del centro activo. Este hecho se corroboró por un incremento de 70 veces en el valor de $K_{i(PR)}$ comparado con el valor obtenido con el enzima *wild-type*.

Para investigar si los aminoácidos mutados en la molécula de la ADA están involucrados en la interacción con los receptores de adenosina, comparamos la unión de los agonistas de los receptores A_1 y A_{2A} en ausencia de la ADA, en presencia de la ADA *wild-type* o en presencia de los diferentes enzimas mutados. Realizamos estos experimentos con concentraciones crecientes de la ADA para determinar, mediante curvas dosis-respuesta, la cantidad de enzima necesaria para producir el 50% del efecto máximo de unión del agonista radiomarcado (valores de EC_{50}); este parámetro puede ser relacionado con la afinidad de la ADA por el receptor. También determinamos el efecto máximo inducido por la ADA, es decir, el efecto producido por la concentración más alta de enzima sobre la unión de radioligando.

Al analizar el efecto de las mutaciones en la hélice α -1 (Leu58Ala, Asp60Ala, Phe61Ala, Leu62Ala, Lys64Ala, Phe65Ala, Asp66Ala y Met69Ala; secuencia Leu58-Ile72) sobre la unión de los agonistas de los receptores A_1 y A_{2A} obtuvimos que, mientras que la mutación Asp66Ala no modificó significativamente el efecto de la ADA *wild-type*, el resto de mutantes se mostraron menos efectivos a la hora de incrementar la unión de los agonistas. Las mutaciones Asp60Ala, Lys64Ala y Phe65Ala afectaron moderadamente tanto el valor de EC_{50} como el incremento de la unión de ligando; la mutación Met69Ala dio lugar a una falta de efecto en la unión del agonista del receptor A_{2A} así como a un incremento de 42 veces en el valor de la EC_{50} sobre el receptor A_1 . Por último, las mutaciones Leu58Ala y Leu62Ala a concentraciones inferiores a los 100 ng/ml fueron incapaces de incrementar la unión de los agonistas a ambos receptores. Estos resultados indican que la hélice α -1 y los residuos Leu58 y Leu62 son importantes para producir el efecto de la ADA sobre los receptores A_1 y A_{2A} , y además el residuo Met69 de la ADA afecta más a la unión de ligandos del receptor A_{2A} que a los ligandos del receptor A_1 .

Se comprobó a continuación el efecto de las mutaciones de los segmentos o secuencias 2 y 3, las cuales forman parte de los bucles situados cerca de la hélice α -1 en la estructura terciaria del enzima. Estas secuencias contienen los residuos Pro114-Asn118 y Met155-Gln158. Los mutantes Ile115Ala, Asn118Ala e His157Ala no produjeron ningún cambio significativo en los valores de EC_{50} ni en el efecto máximo sobre la unión de ligandos comparados con los valores de la ADA *wild-type* sobre ambos receptores. A pesar de que la mutación Met155Ala incremento moderadamente el valor de EC_{50} , sin cambios significativos en la unión máxima de ligando, estos resultados sugieren que estas regiones del enzima no son particularmente importantes para la interacción ADA-receptores de adenosina. El efecto moderado de la mutación Met155Ala, puede ser debido a una alteración estructural transmitida a la estructura terciaria de la proteína que afectaría la conformación de la hélice α -1.

En último lugar, comprobamos el efecto de las mutaciones del segmento 4, bucle que contiene los residuos Ala183-Ile188. Este dominio se encuentra relativamente cerca a la hélice α -1 en la estructura terciaria del enzima, actuando como puerta estructural que cierra el centro catalítico una vez se une el ligando (Kinoshita *et al.* 2005). Los mutantes Gly184Gln y Asp185Ala produjeron un efecto moderado (Gly184Gln) o marcado (Asp185Ala) en el valor de EC_{50} , sin cambios significativos (Gly184Gln) o moderados (Asp185Ala) en la unión máxima de ligando, comparados con la producida por la ADA *wild-type*. Estos resultados indican que este bucle es un dominio importante de la ADA involucrado en la interacción con los receptores de adenosina.

En definitiva, los datos presentados en este trabajo nos llevan a varias conclusiones importantes sobre la interacción de la ADA con los receptores de adenosina A_1 y A_{2A} . En primer lugar, los residuos Leu58-Ile72 de la hélice α -1 y los residuos Ala183-Ile188 del bucle descrito son dominios estructurales importantes para mantener la eficiencia catalítica del enzima, así como para la interacción funcional con ambos receptores. En segundo lugar, podemos concluir que la ADA interacciona con los receptores A_1 y A_{2A} a través de dominios importantes también para el centro activo. Y, por último, nuestros resultados nos permiten sugerir que es la forma abierta de la ADA y no la cerrada la que interacciona funcionalmente con los receptores A_1 y A_{2A} .

Es un hecho conocido que muchas proteínas experimentan cambios conformacionales al interactuar con sus sustratos, con diferentes ligandos o con otras macromoléculas. En el caso de la ADA se ha observado que este enzima tiene dos conformaciones distintas denominadas forma abierta y forma cerrada (Wilson *et al.* 1991; Wilson y Quioco, 1993; Wang y Quioco, 1998; Kinoshita *et al.* 2005). La estructura del enzima consiste en una estructura de barril β con ocho hélices α y ocho láminas β , ((β/α)₈). El centro activo se halla situado en una cavidad muy profunda localizada en el extremo carboxi terminal del barril β , en cuyo interior se encuentra un ion Zn^{2+} fuertemente unido al enzima y que es esencial para su actividad catalítica. En ausencia de ligandos, la entrada del centro activo, que consiste en una hélice α (Thr57-Ala73) y el esqueleto peptídico de una hebra β (Leu182-Asp185), está en la forma abierta. En presencia de sustrato o de ciertos inhibidores, como la desoxicoformicina o el ribósido de purina, se produce un cambio conformacional y el centro activo pasa a la forma cerrada (Wilson *et al.* 1991; Wang y Quioco, 1998; Kinoshita *et al.* 2003; Terasaka *et al.* 2004; Kinoshita *et al.* 2005; Kinoshita *et al.* 2008), aunque permanece accesible al solvente incluso en la forma cerrada de la ADA de mamíferos (Larson *et al.* 2008).

En este trabajo demostramos que la mutación de los residuos hidrofóbicos Leu58 y Leu62, que pertenecen a la hélice α -1 que forma parte de la estructura de la entrada a la cavidad del centro activo, reducen en dos órdenes de magnitud la eficiencia catalítica de enzima, afectando tanto la afinidad para el sustrato como su velocidad máxima. Ésta es la primera demostración del papel de estos dos residuos hidrofóbicos en el mantenimiento de la afinidad por el sustrato adenosina y en el funcionamiento catalítico de la ADA. Además, se ha demostrado que la hélice α -1 y la lámina β del esqueleto polipeptídico, que forman parte de la estructura que cierra la entrada al centro activo del enzima, juegan también un papel muy importante en la interacción con los receptores de A_1 y A_{2A} de adenosina. Si el dominio de interacción entre la ADA y los receptores de adenosina es la estructura responsable de cerrar el centro activo y controla el cambio conformacional entre la forma abierta y la forma cerrada, parece razonable pensar que los receptores A_1 y A_{2A} interactúan con una de estas dos formas. En nuestro trabajo hemos observado que el enzima ADA *wild-type* es capaz de incrementar la unión de ligandos a los receptores de adenosina en preparaciones de membranas estriatales de cerebro tratadas para evitar la presencia de adenosina endógena. En estas condiciones la

ADA se encuentra en la forma abierta (Wilson *et al.* 1991; Kinoshita *et al.* 2003; Kinoshita *et al.* 2005); por lo tanto, parece ser la forma abierta del enzima la que interacciona con los receptores A_1 y A_{2A} .

Es importante destacar que en presencia de desoxicoformicina, inhibidor del estado de transición del enzima, el efecto de la ADA sobre la unión de los agonistas de los receptores A_1 y A_{2A} de adenosina puede ser bloqueada, de acuerdo con un estudio previo (Torvinen *et al.* 2002) en el que se demostró que la ADA bovina inhibida con desoxicoformicina no era capaz de interactuar con el receptor A_1 de adenosina. En presencia de este inhibidor irreversible, la ADA adopta la conformación cerrada (Wang y Quioco, 1998). Estos resultados apoyan la hipótesis de que es la forma abierta y no la cerrada la que es capaz de interactuar con los receptores de adenosina.

El caudado-putamen y el núcleo *accumbens* (las partes dorsales y ventrales del estriado, respectivamente), son regiones cerebrales que median los efectos a largo plazo de la cocaína y en las que abundan tanto receptores D_1 como D_2 ; se ha demostrado que la administración continua de cocaína en estas zonas induce el incremento de los receptores σ_1 , un proceso mediado por los receptores D_1 de dopamina (Zhang *et al.* 2005). En nuestro grupo, hemos demostrado la importancia de los receptores σ_1 y los receptores D_1 de dopamina en los eventos iniciales que causa la exposición a la cocaína (Navarro *et al.* 2010b). De hecho, a través de los heterómeros σ_1 - D_1 , la cocaína potencia de forma significativa la activación de la adenilato ciclasa a través del receptor D_1 . Sin embargo, no se ha descrito la posibilidad de que los receptores σ_1 puedan modular también la función de los receptores D_2 de dopamina. De acuerdo con el objetivo tercero de esta Tesis, estudiar los efectos de la cocaína sobre la función de los receptores D_2 , se ha llevado a cabo la investigación que se reseña en el estudio **“Cocaine inhibits D_2 receptor signalling via sigma-1-dopamine D_2 receptor heteromers”**. En primer lugar, se ha demostrado que los receptores D_2 de dopamina (concretamente, la isoforma larga del receptor) puede formar heterómeros con los receptores σ_1 , interacción que es específica ya que otros miembros de esta familia, los receptores D_3 y D_4 , no forman heterómeros. En segundo lugar, se ha descubierto que los heterómeros σ_1 - D_2 están constituidos por oligómeros de orden superior, con una estructura mínima de heterotetrámeros σ_1 - σ_1 - D_2 - D_2 . En tercer lugar, se ha descrito que los heterómeros σ_1 - D_2 se encuentran en el estriado de ratón. Finalmente, se demuestra

que la cocaína, a través de la unión con los heterómeros σ_1 -D₂, inhibe la señalización de segundos mensajeros tanto en cultivos celulares como en estriado de ratón. .

Se ha demostrado que los receptores σ_1 y D₂ interactúan a nivel molecular y a nivel funcional. Mediante el desarrollo de nuevas técnicas basadas en la transferencia de energía por resonancia, se ha demostrado la oligomerización de los receptores σ_1 en cultivos celulares y que los receptores σ_1 y D₂ pueden formar heterómeros constituidos al menos por un homómero de receptor σ_1 y un homómero de receptor D₂. La unión de la cocaína al receptor σ_1 en el heterómero promueve cambios estructurales en el heterómero que llevan a modificaciones significativas en la función del receptor D₂. La cocaína por sí sola no es capaz de inducir la señalización mediada por proteína G, pero, actuando a través del heterómero σ_1 -D₂, puede disminuir la capacidad del receptor D₂ para señalizar a través de la proteína G_i. De este modo, la inhibición de la producción de AMPc mediada por el receptor D₂ se reduce significativamente por la unión de la cocaína al heterómero de receptores σ_1 -D₂. Además, la cocaína por sí sola, activa la fosforilación de ERK 1/2, un proceso que requiere ambos receptores σ_1 y D₂. Estos resultados indican que la cocaína es un agonista del heterómero σ_1 -D₂ a nivel de la activación de la vía de las MAPK. Paralelamente a lo que ocurre en modelos celulares, la fosforilación de ERK 1/2 mediada por la cocaína se detecta en cortes estriatales de ratón, pero no en cortes estriatales de ratón deficientes en el receptor σ_1 . Dado que la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la cocaína parece ser una característica bioquímica de los heterómeros σ_1 -D₂, estos resultados proporcionan evidencias de su presencia en el estriado. Además, se ha descrito que la cocaína puede inhibir la fosforilación de ERK 1/2 mediada por el receptor D₂. Todos estos datos indican que la unión de la cocaína al heterómero σ_1 -D₂ inhibe la señalización del receptor D₂.

El efecto de la cocaína en la señalización del heterómero σ_1 -D₂ es opuesta al efecto de ésta en la señalización del heterómero σ_1 -D₁ descrita por Navarro y colaboradores (Navarro *et al.* 2010b). En el caso del heterómero σ_1 -D₁, la producción de AMPc mediada por el receptor D₁ se incrementa significativamente por la unión de la cocaína a σ_1 , mientras que para el heterómero σ_1 -D₂, la disminución de la producción de AMPc mediada por el receptor D₂ se inhibe significativamente por la unión de la cocaína a σ_1 . El conjunto de estos resultados, indica que la cocaína produce un incremento selectivo de la señalización inducida por la dopamina a través de la ruta de

la formación de AMPc en neuronas que expresan el receptor D₁ a la vez que inhibe la función mediada por el receptor D₂ en neuronas que expresan el receptor D₂. De forma simultánea, la cocaína altera la señalización a través de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la dopamina en neuronas que expresan el receptor D₁ y en neuronas que expresan el receptor D₂. Estos hallazgos sugieren que la exposición a la cocaína lleva a la desregulación de la señalización de los receptores D₁/D₂ que esta balanceada en situaciones normales. Los datos obtenidos en nuestro grupo de investigación apoyan un papel importante de los receptores σ_1 , por lo menos durante los efectos agudos de la cocaína, no solo incrementando la producción de AMPc mediada por los receptores D₁, sino también impidiendo la señalización del receptor D₂ en los heterómeros σ_1 -D₂. Estos desequilibrios entre la vía directa e indirecta, pueden sustentar los hallazgos descritos por Bateup *et al.* (2010), que encontraron que la respuesta locomotora inducida por tratamiento agudo con cocaína disminuye después de la eliminación de DARP-32 en neuronas estriatonigroentopedunculares, indicando un papel esencial de la vía directa en este comportamiento. En contraposición, las neuronas estriopalidales externas, que expresan los receptores D₂ reducen la activación locomotora inducida por la cocaína. Más recientemente, Luo *et al.* (2011) han demostrado *in vivo* la existencia de efectos agudos de la cocaína mediados tanto por los receptores D₁ como por receptores D₂ de dopamina (incrementos en el flujo de Ca²⁺ mediado por el receptor D₁ y disminuciones en el flujo de Ca²⁺ mediado por el receptor D₂), con una disminución significativa en la dinámica de los efectos mediados por el receptor D₂. Teniendo en cuenta nuestros datos, las observaciones de Luo y colaboradores podrían estar relacionadas con la disminución en la señalización impuesta por la cocaína a través del heterómero σ_1 -D₂. En resumen, los resultados sugieren que tanto la vía directa como la indirecta ejercen un papel importante en el comportamiento motor inducido por la cocaína. En conjunto, todos estos datos proporcionan un nuevo mecanismo global por el cual la cocaína, al unirse a heterómeros σ_1 -D₁ y σ_1 -D₂ afecta las vías directa (D₁) e indirecta (D₂) de manera contrapuesta, proporcionando, al menos en parte, las bases moleculares para explicar por qué en los efectos de la cocaína hay un papel prevalente del receptor D₁ respecto al receptor D₂.

La función del sistema dopaminérgico en el estriado está lateralizada durante la realización de los movimientos voluntarios (Yamamoto *et al.* 1982), y alteraciones interhemisféricas en los niveles de unión de la dopamina a sus receptores, podrían

romper esta lateralización y conducir hacia la aparición de cambios neuropatológicos (Cannon *et al.* 2009). Uno de estos procesos patológicos podría ser la aparición de las discinesias asociadas al tratamiento con L-DOPA en los pacientes de Parkinson, que Bordet y colaboradores ya asociaron en el 1997 con los receptores de dopamina D₁ y D₃. Dos grupos de investigación distintos (Fiorentini *et al.* 2008; Marcellino *et al.* 2008) presentaron resultados que apoyaban la heteromerización D₁-D₃. Los heterómeros identificados tanto en células transfectadas como en estriado de rata, y su expresión, mostraba una sinergia sobre la afinidad de la dopamina que sugiere la presencia de una fuerte regulación del sistema dopaminérgico sobre la vía directa estriatal del movimiento.

Con el objetivo de investigar la presencia de heterómeros D₁-D₃ en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, y demostrar el papel que puede jugar el heterómero e la aparición de las discinesias inducidas por el tratamiento con levodopa, se ha desarrollado el trabajo “**Lack of lateralization of dopamine D₁-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia**”. Los resultados consistentes en valores de unión máxima o B_{max} en muestras estriatales mostraron un incremento elevado en la expresión del receptor D₃ en las muestras de ratas discinéticas. Por otra parte, encontramos, entre ambos lados del estriado de muestras de ratas *naïve*, una asimetría en los valores de afinidad en la unión de los agonistas por los receptores estriatales de dopamina D₁. Esta lateralización del sistema dopaminérgico ya fue demostrada para el receptor D₂ (Schneider *et al.* 1982), y podría deberse a diferencias en la estructura cuaternaria de los GPCRs de cada lado del estriado. Se ha postulado que la estructura cuaternaria de los GPCRs puede ser modificada bien por la heteromerización con otros GPCRs bien por interacciones alostéricas con otras proteínas, como GPCRs u otras (Navarro *et al.* 2010a). La expresión del receptor D₃ en las ratas *naïve* y lesionadas es relativamente baja, por lo que no creemos que las diferencias de expresión del D₃ comparando los dos hemisferios sea la causa de la asimetría estriatal en la afinidad del receptor D₁. El *cross-talk* positivo, consistente en la mejora en la afinidad del receptor D₁ por sus ligandos promovida por la activación del D₃, es una huella bioquímica de la presencia del heterómero en la muestra, y sólo se ha encontrado en las muestras de animales discinéticos, La identificación del *cross-talk* coincide con la desaparición de la lateralización hallada en los animales *naïve* y lesionados, lo cual apunta a un desequilibrio fisiológico en la vía estriatal indirecta del movimiento. Nuestros

resultados no son los únicos que apoyan la lateralización dopaminérgica en el cerebro humano sano, ya se que han encontrado diferencias intercerebrales en las afinidades del D₁ empleando la técnica de PET (Cannon *et al.* 2009), así como una asimetría en los niveles de la dopamina interestriatales (Silva *et al.* 2007). La aparición de las discinesias correlaciona con una neurotransmisión del receptor D₁ equilibrada entre ambos hemisferios, ya que la lateralización persiste en animales lesionados y en animales lesionados tratados con L-DOPA no discinéticos. Un punto a esclarecer en el futuro, con más experimentos, es si este equilibrio causado por la L-DOPA podría ser la causa o una consecuencia de la discinesia. Por otra parte la discinesia pero no la lesión o el mero tratamiento de L-DOPA, indujo la aparición del *cross-talk* positivo como huella bioquímica del heterómero D₁-D₃, y que junto con los datos de los experimentos de PLA, permite correlacionar la discinesia con los incrementos de tanto en la expresión del receptor D₃ como del conjunto del heterómero de estudio.

Con todo esto, nuestros resultados apoyan que las ratas discinéticas muestran un desbalance marcado proporcional al nivel de heterómeros D₁-D₃. Siguiendo en la línea de los experimentos de Lee y colaboradores en el 2002, un incremento de los heterómeros que contienen el receptor D₁ mejora la neurotransmisión dopaminérgica. Existen evidencias de que la activación crónica producida por la L-DOPA incrementando el número de receptores D₁-D₃, conduciría hacia una importante potenciación de la vía directa del movimiento, lo que sería beneficioso si la vía indirecta del movimiento estuviera intacta. Pero como muestran nuestros resultados, los estados de discinesia, provocados por un desbalance en las vías motoras del cerebro, serían provocados por una activación anómala de la vía directa sumada a una débil señalización de la vía indirecta.

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

Conclusiones que hacen referencia al primer objetivo de la Tesis: *Determinar los cambios en la expresión, la farmacología y la heteromerización de los receptores D₂ de dopamina, A_{2A} de adenosina y CB₁ de cannabinoides en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, en diferentes estados de progresión:*

Los receptores de adenosina A_{2A}, de cannabinoides CB₁ y de dopamina D₂ forman heterómeros en el núcleo caudado de *Macaca fascicularis* no lesionados o lesionados con MPTP pero no en el putamen, donde estos receptores se expresan en niveles similares o superiores. La unión de la dopamina al receptor D₂ se modula negativamente cuando se activan individualmente los receptores A_{2A} o CB₁ pero no cuando se co-activan. Esta propiedad bioquímica, que únicamente se observa en el caudado, correlaciona la expresión de los heterómeros en el caudado pero no en el putamen de los macacos no lesionados y lesionados, por lo que constituye una característica del heterómero.

La interacción negativa a nivel de unión de ligandos se observa también en el estriado de ratas no lesionadas y lesionadas con 6-hidroxidopamina, indicando la expresión de heterómeros A_{2A}-CB₁-D₂ en el estriado de estos animales.

La aparición de discinesia en los macacos o ratas por el tratamiento de L-DOPA comporta la pérdida de la expresión de los heterómeros A_{2A}-CB₁-D₂ en el caudado de macacos y en el estriado de ratas, sin variaciones significativas en la expresión de los diferentes receptores.

Los heterómeros de receptores A_{2A}-CB₁-D₂ constituyen una diana terapéutica en la enfermedad de Parkinson y su disrupción correlaciona con la aparición de las discinesias inducidas por L-DOPA.

Conclusiones que hacen referencia al segundo objetivo de la Tesis: *Identificar los dominios estructurales implicados en la interacción de la ADA con los receptores A₁ y A_{2A}, y en la modulación de su actividad catalítica:*

Mediantes técnicas de mutagénesis dirigida hemos demostrado que las mutaciones Leu58Ala y Leu62Ala sobre la ADA humana disminuyen su eficacia catalítica (K_{CAT}/K_M) en dos órdenes de magnitud, mientras que las mutaciones Phe61Ala, Phe65Ala, Met69Ala y Met155Ala disminuyen la eficiencia catalítica en un orden de magnitud; el resto de mutaciones diseñadas en nuestro estudio no modificaron apreciablemente las características cinéticas respecto al enzima *wild-type*. Ésta es la primera demostración del importante papel de residuos de carácter hidrofóbico en el mantenimiento de la afinidad de la ADA por la adenosina y en el control del proceso catalítico.

En general, las mutaciones que más afectan las características cinéticas de la ADA están implicadas en la interacción del enzima con los receptores A₁ y A_{2A} de adenosina, extremo analizado en base a la alteración producida por cada enzima mutado sobre las afinidades de los correspondientes ligandos de dichos receptores. Los resultados obtenidos sugieren que la hélice alfa del enzima, que contiene los residuos Leu58 a Met69, es un determinante estructural clave en su interacción con los dos receptores de adenosina analizados y que los aminoácidos Leu58 y Leu62 juegan un papel especialmente relevante en dicha interacción. Por otra parte el residuo Asp185 del bucle que, junto a la hélice alfa, cierra el centro activo del enzima es también importante para la interacción con los receptores, especialmente con el A_{2A}. El conjunto de nuestros resultados sugiere, además, que es la forma abierta de la ADA y no la cerrada la que es capaz de interactuar funcionalmente con los receptores de adenosina.

Conclusiones que hacen referencia al tercer objetivo de la Tesis: *Estudiar si los receptores D₂ de dopamina pueden formar heterómeros con los receptores sigma-1 e investigar el efecto que ejerce la cocaína, mediado por estos heterómeros, en la transmisión dopaminérgica:*

Los receptores sigma-1 forman heterómeros con los receptores D₂ de dopamina pero no con los otros miembros de la familia D₂, los receptores D₃ o D₄. Estos heterómeros están constituidos como mínimo por la interacción entre homodímeros de sus componentes y se expresan tanto en células transfectadas como en el estriado de ratón.

La unión de la cocaína al receptor sigma-1 induce cambios estructurales y funcionales en los heterómeros σ -1-D₂. La cocaína, interaccionando con sigma-1, es capaz de incrementar la señalización inducida por agonistas de receptores D₁ de dopamina hacia la producción de AMPc e inhibir los decrementos de AMPc inducidos por agonistas del receptor D₂ y, simultáneamente, la cocaína es capaz de bloquear la fosforilación de ERK 1/2 inducida por agonistas del receptor D₂. Esto podría resultar en una desregulación del balance entre las vías directa e indirecta del estriado que contienen neuronas que expresan receptores D₁ y D₂ respectivamente. Estos resultados constituyen nuevas perspectivas en el entendimiento de las acciones a corto plazo de esta droga.

Conclusiones que hacen referencia al cuarto objetivo de la Tesis: *Determinar la existencia de heterómeros D₁-D₃ y demostrar el papel importante del heterómero en la etiología de las discinesias inducidas por el tratamiento con L-DOPA, empleando modelos animales de la enfermedad de Parkinson:*

Se ha detectado un gran incremento del receptor D₃ en ambos hemisferios (más marcado en el lado ipsilateral) de las ratas discinéticas. Sin embargo, el receptor D₁ sólo incrementa su expresión en el hemisferio lesionado, mientras mantiene sus niveles en el contralateral. Además, se investigó la formación de *cross-talk* o interacciones cruzadas entre en los receptores D₁ y D₃, como un *fingerprint* o huella bioquímica de la presencia de heterómeros entre estos dos receptores, empleando ligandos radioactivos. Solamente se ha detectado el *cross-talk* positivo en el lado ipsilateral de las ratas lesionadas discinéticas, consistente en un aumento en la afinidad del receptor D₁ por sus ligandos cuando el receptor D₃ es activado por su agonista selectivo. En todas las condiciones, en el lado contralateral a la lesión el receptor D₁ siempre se muestra más afín a sus ligandos, así como no se observa ningún tipo de interacción cruzada.

Gracias al uso de la novedosa técnica de la PLA (*Proximity Ligation Assay*) *in situ*, que permite detectar interacciones moleculares entre dos proteínas que se encuentran muy cercanas directamente en el tejido, detectamos que el mayor número de células positivas (que presentan el heterómero D₁-D₃) se encuentra en el estriado de las ratas lesionadas discinéticas. Además, gracias al poco tejido necesario para llevarla a cabo, nos permitió confirmar este hallazgo inicial de rata sobre muestras del modelo parkinsoniano de primate no humano (el macaco lesionado bilateralmente con la neurotoxina MPTP).

Todos estos resultados muestran que el incremento en la expresión del receptor D₃ en los animales discinéticos induce la heteromerización D₁-D₃ en ambos hemisferios cerebrales. Además, la activación del receptor D₃ incrementa la afinidad del D₁ hasta llegar a equilibrarse con el lado contrario (lográndose una simetría). Estos hechos podrían ser responsables del patrón de inicio de las discinesias inducidas por el tratamiento de L-DOPA.

BIBLIOGRAFÍA



- Abbracchio, M. P., R. Brambilla, S. Ceruti, H. O. Kim, D. K. von Lubitz, K. A. Jacobson y F. Cattabeni (1995). **G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain.** Mol Pharmacol 48(6): 1038-45.
- AbdAlla, S., H. Lothar y U. Quitterer (2000). **AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration.** Nature 407(6800): 94-8.
- Abi-Dargham, A., L. S. Kegeles, Y. Zea-Ponce, O. Mawlawi, D. Martinez, V. Mitropoulou, K. O'Flynn, H. W. Koenigsberg, R. Van Heertum, T. Cooper, M. Laruelle y L. J. Siever (2004). **Striatal amphetamine-induced dopamine release in patients with schizotypal personality disorder studied with single photon emission computed tomography and [123I]iodobenzamide.** Biol Psychiatry 55(10): 1001-6.
- Adell, A. y F. Artigas (2004). **The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems.** Neurosci Biobehav Rev 28(4): 415-31.
- Agnati, L. F., S. Ferre, C. Lluís, R. Franco y K. Fuxe (2003). **Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons.** Pharmacol Rev 55(3): 509-50.
- Agnati, L. F., K. Fuxe y S. Ferre (2005). **How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity.** Trends Biochem Sci 30(4): 188-93.
- Albin, R. L., A. B. Young y J. B. Penney (1989). **The functional anatomy of basal ganglia disorders.** Trends Neurosci 12(10): 366-75.
- Albizu, L., M. N. Balestre, C. Breton, J. P. Pin, M. Manning, B. Mouillac, C. Barberis y T. Durroux (2006). **Probing the existence of G protein-coupled receptor dimers by positive and negative ligand-dependent cooperative binding.** Mol Pharmacol 70(5): 1783-91.
- Alexander, G. E., M. D. Crutcher y M. R. DeLong (1990). **Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions.** Prog Brain Res 85: 119-46.
- Alonso, G., V. Phan, I. Guillemain, M. Saunier, A. Legrand, M. Anoaï y T. Maurice (2000). **Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system.** Neuroscience 97(1): 155-70.
- Anderson, S. M. y R. C. Pierce (2005). **Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement.** Pharmacol Ther 106(3): 389-403.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilal-Dandan, D. Chelsky, M. Dennis y M. Bouvier (2000). **Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET).** Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3684-9.
- Antle, M. C., N. M. Steen y R. E. Mistlberger (2001). **Adenosine and caffeine modulate circadian rhythms in the Syrian hamster.** Neuroreport 12(13): 2901-5.
- Arredondo-Vega, F. X., I. Santisteban, S. Daniels, S. Toutain y M. S. Hershey (1998). **Adenosine deaminase deficiency: genotype-phenotype correlations based on expressed activity of 29 mutant alleles.** Am J Hum Genet 63(4): 1049-59.
- Baan, B., E. Pardali, P. ten Dijke y H. van Dam (2010). **In situ proximity ligation detection of c-Jun/AP-1 dimers reveals increased levels of c-Jun/Fra1**

- complexes in aggressive breast cancer cell lines in vitro and in vivo.** Mol Cell Proteomics 9(9): 1982-90.
- Bai, M., S. Trivedi y E. M. Brown (1998). **Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells.** J Biol Chem 273(36): 23605-10.
- Baker, D., G. Pryce, G. Giovannoni y A. J. Thompson (2003). **The therapeutic potential of cannabis.** Lancet Neurol 2(5): 291-8.
- Banales, J. L., E. Rivera-Martinez, L. Perez-Gonzalez, M. Selman, Y. Raymond y A. Nava (1999). **Evaluation of adenosine deaminase activity in the Mycobacterium tuberculosis culture supernatants.** Arch Med Res 30(5): 358-9.
- Baraldi, P. G., R. Romagnoli, D. Preti, F. Fruttarolo, M. D. Carrion y M. A. Tabrizi (2006). **Ligands for A2B adenosine receptor subtype.** Curr Med Chem 13(28): 3467-82.
- Bardo, M. T. (1998). **Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens.** Crit Rev Neurobiol 12(1-2): 37-67.
- Barishpolets, V. V., O. Fedotova Iu y N. S. Sapronov (2009). **[Structural and functional organization of the cerebral dopaminergic system].** Eksp Klin Farmakol 72(3): 44-9.
- Bateup, H. S., E. Santini, W. Shen, S. Birnbaum, E. Valjent, D. J. Surmeier, G. Fisone, E. J. Nestler y P. Greengard (2010). **Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors.** Proc Natl Acad Sci U S A 107(33): 14845-50.
- Beal, M. F. (2010). **Parkinson's disease: a model dilemma.** Nature 466(7310): S8-10.
- Beaulieu, J. M. y R. R. Gainetdinov (2011). **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.** Pharmacol Rev 63(1): 182-217.
- Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis y D. Piomelli (1997). **Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.** Science 277(5329): 1094-7.
- Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup y K. T. Jeang (1997). **Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32.** J Biol Chem 272(49): 30603-6.
- Benkirane, M., D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup y K. T. Jeang (1997). **Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32.** J Biol Chem 272(49): 30603-6.
- Ben-Shahar, O., P. Keeley, M. Cook, W. Brake, M. Joyce, M. Nyffeler, R. Heston y A. Ettenberg (2007). **Changes in levels of D1, D2, or NMDA receptors during withdrawal from brief or extended daily access to IV cocaine.** Brain Res 1131(1): 220-8.
- Berridge, M. J. (2009). **Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms.** Biochim Biophys Acta 1793(6): 933-40.
- Berthouze, M., L. Rivail, A. Lucas, M. A. Ayoub, O. Russo, S. Sicsic, R. Fischmeister, I. Berque-Bestel, R. Jockers y F. Lezoualc'h (2007). **Two transmembrane Cys residues are involved in 5-HT4 receptor dimerization.** Biochem Biophys Res Commun 356(3): 642-7.
- Bertolino, A., L. Fazio, A. Di Giorgio, G. Blasi, R. Romano, P. Taurisano, G. Caforio, L. Sinibaldi, G. Ursini, T. Papolizio, E. Tirota, A. Papp, B. Dallapiccola, E. Borrelli y W. Sadee (2009). **Genetically determined interaction between the dopamine transporter and the D2 receptor on prefronto-striatal activity and volume in humans.** J Neurosci 29(4): 1224-34.

- Bertran-Gonzalez, J., C. Bosch, M. Maroteaux, M. Matamales, D. Herve, E. Valjent y J. A. Girault (2008). **Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol.** *J Neurosci* 28(22): 5671-85.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov y J. T. Greenamyre (2000). **Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease.** *Nat Neurosci* 3(12): 1301-6.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, D. A. Di Monte y J. T. Greenamyre (2002). **Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis.** *Brain Pathol* 12(4): 499-510.
- Beuming, T., J. Kniazeff, M. L. Bergmann, L. Shi, L. Gracia, K. Raniszewska, A. H. Newman, J. A. Javitch, H. Weinstein, U. Gether y C. J. Loland (2008). **The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap.** *Nat Neurosci* 11(7): 780-9.
- Beyer, K., M. Domingo-Sabat, C. Santos, E. Tolosa, I. Ferrer y A. Ariza (2010). **The decrease of beta-synuclein in cortical brain areas defines a molecular subgroup of dementia with Lewy bodies.** *Brain* 133(Pt 12): 3724-33.
- Beyer, K. (2013). **The first genetic biomarker for dementia with Lewy bodies.** *Biomark Med* 7(6): 909-11.
- Beyer, K. y A. Ariza (2013). **Alpha-synuclein posttranslational modification and alternative splicing as a trigger for neurodegeneration.** *Mol Neurobiol* 47(2): 509-24.
- Bezard, E., S. Dovero, C. Prunier, P. Ravenscroft, S. Chalon, D. Guilloteau, A. R. Crossman, B. Bioulac, J. M. Brotchie y C. E. Gross (2001). **Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease.** *J Neurosci* 21(17): 6853-61.
- Bezard, E., S. Ferry, U. Mach, H. Stark, L. Leriche, T. Boraud, C. Gross y P. Sokoloff (2003). **Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function.** *Nat Med* 9(6): 762-7.
- Bjorness, T. E., C. L. Kelly, T. Gao, V. Poffenberger y R. W. Greene (2009). **Control and function of the homeostatic sleep response by adenosine A1 receptors.** *J Neurosci* 29(5): 1267-76.
- Blandini, F., M. T. Armentero y E. Martignoni (2008). **The 6-hydroxydopamine model: news from the past.** *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2: S124-9.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul y J. M. Verna (2001). **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.** *Prog Neurobiol* 65(2): 135-72.
- Bockers, T. M., M. G. Mameza, M. R. Kreutz, J. Bockmann, C. Weise, F. Buck, D. Richter, E. D. Gundelfinger y H. J. Kreienkamp (2001). **Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein alpha-fodrin.** *J Biol Chem* 276(43): 40104-12.
- Bohm, S. K., E. F. Grady y N. W. Bunnett (1997). **Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors.** *Biochem J* 322 (Pt 1): 1-18.
- Bonifati, V., M. C. Dekker, N. Vanacore, G. Fabbrini, F. Squitieri, R. Marconi, A. Antonini, P. Brustenghi, A. Dalla Libera, M. De Mari, F. Stocchi, P. Montagna, V. Gallai, P. Rizzu, J. C. van Swieten, B. Oostra, C. M. van Duijn, G. Meco y P.

- Heutink (2002). **Autosomal recessive early onset parkinsonism is linked to three loci: PARK2, PARK6, and PARK7.** *Neurol Sci* 23 Suppl 2: S59-60.
- Bonito-Oliva, A., M. Feyder y G. Fisone (2011). **Deciphering the Actions of Antiparkinsonian and Antipsychotic Drugs on cAMP/DARPP-32 Signaling.** *Front Neuroanat* 5: 38.
- Bordet, R., S. Ridray, S. Carboni, J. Diaz, P. Sokoloff y J. C. Schwartz (1997). **Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7): 3363-7.
- Boulay, F. y M. J. Rabiet (2005). **The chemoattractant receptors FPR and C5aR: same functions--different fates.** *Traffic* 6(2): 83-6.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders y F. McCormick (1991). **The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism.** *Nature* 349(6305): 117-27.
- Bouvier, M. (2001). **Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors.** *Nat Rev Neurosci* 2(4): 274-86.
- Bouvier, M., N. Heveker, R. Jockers, S. Marullo y G. Milligan (2007). **BRET analysis of GPCR oligomerization: newer does not mean better.** *Nat Methods* 4(1): 3-4; author reply 4.
- Bove, J. y C. Perier (2012). **Neurotoxin-based models of Parkinson's disease.** *Neuroscience* 211: 51-76.
- Bradberry, C. W. (2000). **Acute and chronic dopamine dynamics in a nonhuman primate model of recreational cocaine use.** *J Neurosci* 20(18): 7109-15.
- Breivogel, C. S., J. M. Lambert, S. Gerfin, J. W. Huffman y R. K. Razdan (2008). **Sensitivity to delta9-tetrahydrocannabinol is selectively enhanced in beta-arrestin2 -/- mice.** *Behav Pharmacol* 19(4): 298-307.
- Brown, R. M. y J. L. Short (2008). **Adenosine A(2A) receptors and their role in drug addiction.** *J Pharm Pharmacol* 60(11): 1409-30.
- Burgueno, J., D. J. Blake, M. A. Benson, C. L. Tinsley, C. T. Esapa, E. I. Canela, P. Penela, J. Mallol, F. Mayor, Jr., C. Lluís, R. Franco y F. Ciruela (2003). **The adenosine A2A receptor interacts with the actin-binding protein alpha-actinin.** *J Biol Chem* 278(39): 37545-52.
- Burgueno, J., C. Enrich, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco y F. Ciruela (2003). **Metabotropic glutamate type 1alpha receptor localizes in low-density caveolin-rich plasma membrane fractions.** *J Neurochem* 86(4): 785-91.
- Burnstock, G. (2009). **Purinergic receptors and pain.** *Curr Pharm Des* 15(15): 1717-35.
- Cabello, N., R. Remelli, L. Canela, A. Soriguera, J. Mallol, E. I. Canela, M. J. Robbins, C. Lluís, R. Franco, R. A. McIlhinney y F. Ciruela (2007). **Actin-binding protein alpha-actinin-1 interacts with the metabotropic glutamate receptor type 5b and modulates the cell surface expression and function of the receptor.** *J Biol Chem* 282(16): 12143-53.
- Cadas, H., S. Gaillet, M. Beltramo, L. Venance y D. Piomelli (1996). **Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP.** *J Neurosci* 16(12): 3934-42.
- Caenazzo, L., M. R. Hoehe, W. T. Hsieh, W. H. Berrettini, T. I. Bonner y E. S. Gershon (1991). **HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR).** *Nucleic Acids Res* 19(17): 4798.
- Caine, S. B., S. S. Negus, N. K. Mello y J. Bergman (1999). **Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists in rats that self-administer cocaine.** *J Pharmacol Exp Ther* 291(1): 353-60.

- Caine, S. B., S. S. Negus, N. K. Mello, S. Patel, L. Bristow, J. Kulagowski, D. Vallone, A. Saiardi y E. Borrelli (2002). **Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists.** *J Neurosci* 22(7): 2977-88.
- Canals, M., D. Marcellino, F. Fanelli, F. Ciruela, P. de Benedetti, S. R. Goldberg, K. Neve, K. Fuxe, L. F. Agnati, A. S. Woods, S. Ferre, C. Lluís, M. Bouvier y R. Franco (2003). **Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer.** *J Biol Chem* 278(47): 46741-9.
- Canals, M., J. Burgueno, D. Marcellino, N. Cabello, E. I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, S. Ferre, M. Bouvier, K. Fuxe, F. Ciruela, C. Lluís y R. Franco (2004). **Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer.** *J Neurochem* 88(3): 726-34.
- Canals, M., E. Angulo, V. Casado, E. I. Canela, J. Mallol, F. Vinals, W. Staines, B. Tinner, J. Hillion, L. Agnati, K. Fuxe, S. Ferre, C. Lluís y R. Franco (2005). **Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures.** *J Neurochem* 92(2): 337-48.
- Cannon, D. M., J. M. Klaver, S. A. Peck, D. Rallis-Voak, K. Erickson y W. C. Drevets (2009). **Dopamine type-1 receptor binding in major depressive disorder assessed using positron emission tomography and [11C]NNC-112.** *Neuropsychopharmacology* 34(5): 1277-87.
- Carlsson, A., N. Waters, S. Holm-Waters, J. Tedroff, M. Nilsson y M. L. Carlsson (2001). **Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 237-60.
- Carlucci, F., F. Rosi, C. Di Pietro, E. Marinello, M. Pizzichini y A. Tabucchi (1997). **Purine nucleotide metabolism: specific aspects in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes.** *Biochim Biophys Acta* 1360(3): 203-10.
- Carriba, P., O. Ortiz, K. Patkar, Z. Justinova, J. Stroik, A. Themann, C. Muller, A. S. Woods, B. T. Hope, F. Ciruela, V. Casado, E. I. Canela, C. Lluís, S. R. Goldberg, R. Moratalla, R. Franco y S. Ferre (2007). **Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids.** *Neuropsychopharmacology* 32(11): 2249-59.
- Carriba, P., G. Navarro, F. Ciruela, S. Ferre, V. Casado, L. Agnati, A. Cortes, J. Mallol, K. Fuxe, E. I. Canela, C. Lluís y R. Franco (2008). **Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET.** *Nat Methods* 5(8): 727-33.
- Carson, D. A., D. B. Wasson, E. Lakow y N. Kamatani (1982). **Possible metabolic basis for the different immunodeficient states associated with genetic deficiencies of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(12): 3848-52.
- Casado, V., J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís y R. Franco (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(1-2): 221-4.
- Casado, V., A. Cortes, F. Ciruela, J. Mallol, S. Ferre, C. Lluís, E. I. Canela y R. Franco (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(3): 343-54.
- Casado, V., A. Cortes, J. Mallol, K. Perez-Capote, S. Ferre, C. Lluís, R. Franco y E. I. Canela (2009a). **GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers?** *Pharmacol Ther* 124(2): 248-57.
- Casado, V., C. Ferrada, J. Bonaventura, E. Gracia, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís, A. Cortes y R. Franco (2009b). **Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation.** *Biochem Pharmacol* 78(12): 1456-63.
- Cenci, M. A. (2007). **L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment.** *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3: S263-7.
- Centonze, D., B. Picconi, C. Baunez, E. Borrelli, A. Pisani, G. Bernardi y P. Calabresi (2002). **Cocaine and amphetamine depress striatal GABAergic synaptic transmission through D2 dopamine receptors.** *Neuropsychopharmacology* 26(2): 164-75.
- Centonze, D., C. Grande, E. Saulle, A. B. Martin, P. Gubellini, N. Pavon, A. Pisani, G. Bernardi, R. Moratalla y P. Calabresi (2003). **Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity.** *J Neurosci* 23(24): 8506-12.
- Chapuis, S., L. Ouchchane, O. Metz, L. Gerbaud y F. Durif (2005). **Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life.** *Mov Disord* 20(2): 224-30.
- Chausmer, A. L., G. I. Elmer, M. Rubinstein, M. J. Low, D. K. Grandy y J. L. Katz (2002). **Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice.** *Psychopharmacology (Berl)* 163(1): 54-61.
- Chechik, B. E., W. P. Schrader y J. Minowada (1981). **An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines.** *J Immunol* 126(3): 1003-7.
- Chiba, S., H. Matsumoto, M. Saitoh, M. Kasahara, M. Matsuya y M. Kashiwagi (1995). **A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease.** *J Neurol Sci* 132(2): 170-3.
- Choi, W. J., H. W. Lee, H. O. Kim, M. Chinn, Z. G. Gao, A. Patel, K. A. Jacobson, H. R. Moon, Y. H. Jung y L. S. Jeong (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(23): 8003-11.
- Christopoulos, A. y T. Kenakin (2002). **G protein-coupled receptor allosterism and complexing.** *Pharmacol Rev* 54(2): 323-74.
- Chun, M., U. K. Liyanage, M. P. Lisanti y H. F. Lodish (1994). **Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(24): 11728-32.
- Ciruela, F., C. Saura, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (1996). **Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors.** *FEBS Lett* 380(3): 219-23.
- Ciruela, F., M. Escriche, J. Burgueno, E. Angulo, V. Casado, M. M. Soloviev, E. I. Canela, J. Mallol, W. Y. Chan, C. Lluís, R. A. McIlhinney y R. Franco (2001).

- Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes.** *J Biol Chem* 276(21): 18345-51.
- Ciruela, F., J. Burgueno, V. Casado, M. Canals, D. Marcellino, S. R. Goldberg, M. Bader, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre y A. S. Woods (2004). **Combining mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors.** *Anal Chem* 76(18): 5354-63.
- Ciruela, F., L. Canela, J. Burgueno, A. Soriguera, N. Cabello, E. I. Canela, V. Casado, A. Cortes, J. Mallol, A. S. Woods, S. Ferre, C. Lluís y R. Franco (2005). **Heptaspanning membrane receptors and cytoskeletal/scaffolding proteins: focus on adenosine, dopamine, and metabotropic glutamate receptor function.** *J Mol Neurosci* 26(2-3): 277-92.
- Ciruela, F., V. Casado, R. J. Rodrigues, R. Lujan, J. Burgueno, M. Canals, J. Borycz, N. Rebola, S. R. Goldberg, J. Mallol, A. Cortes, E. I. Canela, J. F. Lopez-Gimenez, G. Milligan, C. Lluís, R. A. Cunha, S. Ferre y R. Franco (2006). **Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers.** *J Neurosci* 26(7): 2080-7.
- Ciruela, F. (2008). **Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells.** *Curr Opin Biotechnol* 19(4): 338-43.
- Ciruela, F., C. Albergaria, A. Soriano, L. Cuffi, L. Carbonell, S. Sanchez, J. Gandia y V. Fernandez-Duenas (2010). **Adenosine receptors interacting proteins (ARIPs): Behind the biology of adenosine signaling.** *Biochim Biophys Acta* 1798(1): 9-20.
- Civelli, O., J. R. Bunzow y D. K. Grandy (1993). **Molecular diversity of the dopamine receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 281-307.
- Claing, A., S. J. Perry, M. Achiriloaie, J. K. Walker, J. P. Albanesi, R. J. Lefkowitz y R. T. Premont (2000). **Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1119-24.
- Climont, N., J. M. Martínez-Navio, C. Gil, F. Garcia, C. Rovira, C. Hurtado, L. Miralles, J. M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (2009). **Adenosine deaminase enhances T-cell response elicited by dendritic cells loaded with inactivated HIV.** *Immunol Cell Biol* 87(8): 634-9.
- Cobos, E. J., J. M. Entrena, F. R. Nieto, C. M. Cendan y E. Del Pozo (2008). **Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands.** *Curr Neuropharmacol* 6(4): 344-66.
- Colpaert, F. C., C. J. Niemegeers y P. A. Janssen (1978). **Neuroleptic interference with the cocaine cue: internal stimulus control of behavior and psychosis.** *Psychopharmacology (Berl)* 58(3): 247-55.
- Conway, E. J. y R. Cooke (1939). **The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues.** *Biochem J* 33(4): 479-92.
- Cooper J. R., B. F. E. a. R. R. H. (1996). *The biochemical basis of neuropharmacology.* New York/Oxford, Oxford University Press: 293-351.
- Corrigall, W. A. y K. M. Coen (1991). **Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists.** *Pharmacol Biochem Behav* 39(3): 799-802.
- Costa, T. y A. Herz (1989). **Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19): 7321-5.

- Cote, S. R., V. C. Chitravanshi, C. Bleickardt, H. N. Sapru y E. V. Kuzhikandathil (2014). **Overexpression of the dopamine D3 receptor in the rat dorsal striatum induces dyskinetic behaviors.** *Behav Brain Res.*
- Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner y N. B. Gilula (1996). **Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.** *Nature* 384(6604): 83-7.
- Cristalli, G., S. Costanzi, C. Lambertucci, G. Lupidi, S. Vittori, R. Volpini y E. Camaioni (2001). **Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors.** *Med Res Rev* 21(2): 105-28.
- Crossman, A. R. (1987). **Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders.** *Neuroscience* 21(1): 1-40.
- Cvejić, S. y L. A. Devi (1997). **Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization.** *J Biol Chem* 272(43): 26959-64.
- Daaka, Y., L. M. Luttrell, S. Ahn, G. J. Della Rocca, S. S. Ferguson, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1998). **Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem* 273(2): 685-8.
- Daddona, P. E., D. S. Shewach, W. N. Kelley, P. Argos, A. F. Markham y S. H. Orkin (1984). **Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence.** *J Biol Chem* 259(19): 12101-6.
- Daigle, T. L., M. L. Kwok y K. Mackie (2008). **Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism.** *J Neurochem* 106(1): 70-82.
- Dal Toso, R., B. Sommer, M. Ewert, A. Herb, D. B. Pritchett, A. Bach, B. D. Shivers y P. H. Seeburg (1989). **The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing.** *EMBO J* 8(13): 4025-34.
- Dale, M. (2000). *Sistema nervioso central: Otros neurotransmisores y neuromoduladores: Dopamina. Farmacología.* Barcelona, Harcourt.
- Dalley, J. W. y B. J. Everitt (2009). **Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry.** *Semin Cell Dev Biol* 20(4): 403-10.
- Dauer, W. y S. Przedborski (2003). **Parkinson's disease: mechanisms and models.** *Neuron* 39(6): 889-909.
- Dawson, T. M., H. S. Ko y V. L. Dawson (2010). **Genetic animal models of Parkinson's disease.** *Neuron* 66(5): 646-61.
- De, A. (2011). **The new era of bioluminescence resonance energy transfer technology.** *Curr Pharm Biotechnol* 12(4): 558-68.
- de Almeida, J. y G. Mengod (2010). **D2 and D4 dopamine receptor mRNA distribution in pyramidal neurons and GABAergic subpopulations in monkey prefrontal cortex: implications for schizophrenia treatment.** *Neuroscience* 170(4): 1133-9.
- De Mei, C., M. Ramos, C. Iitaka y E. Borrelli (2009). **Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors.** *Curr Opin Pharmacol* 9(1): 53-8.
- De Wit, H. y R. A. Wise (1977). **Blockade of cocaine reinforcement in rats with the dopamine receptor blocker pimozide, but not with the noradrenergic blockers phentolamine or phenoxybenzamine.** *Can J Psychol* 31(4): 195-203.
- Dearry, A., J. A. Gingrich, P. Falardeau, R. T. Freneau, Jr., M. D. Bates y M. G. Caron (1990). **Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor.** *Nature* 347(6288): 72-6.

- DeFea, K. A., J. Zalevsky, M. S. Thoma, O. Dery, R. D. Mullins y N. W. Bunnett (2000). **beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2.** J Cell Biol 148(6): 1267-81.
- DeFea, K. A. (2011). **Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold?** Cell Signal 23(4): 621-9.
- Del Castillo, J. y B. Katz (1957). **Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives.** Proc R Soc Lond B Biol Sci 146(924): 369-81.
- DeLong, M. R. (1990). **Primate models of movement disorders of basal ganglia origin.** Trends Neurosci 13(7): 281-5.
- Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger y R. Mechoulam (1992). **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** Science 258(5090): 1946-9.
- Devi, L. A. (2001). **Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking.** Trends Pharmacol Sci 22(10): 532-7.
- Di Chiara, G. y V. Bassareo (2007). **Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do.** Curr Opin Pharmacol 7(1): 69-76.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J.C. Schwartz, y D. Piomelli. (1994). **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** Nature(372): 686-691.
- Dickinson, S. D., J. Sabeti, G. A. Larson, K. Giardina, M. Rubinstein, M. A. Kelly, D. K. Grandy, M. J. Low, G. A. Gerhardt y N. R. Zahniser (1999). **Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum.** J Neurochem 72(1): 148-56.
- Dong, R. P., J. Kameoka, M. Hegen, T. Tanaka, Y. Xu, S. F. Schlossman y C. Morimoto (1996). **Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response.** J Immunol 156(4): 1349-55.
- Dong, R. P. y C. Morimoto (1996). **Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation.** Hum Cell 9(3): 153-62.
- Dong, R. P., K. Tachibana, M. Hegen, Y. Munakata, D. Cho, S. F. Schlossman y C. Morimoto (1997). **Determination of adenosine deaminase binding domain on CD26 and its immunoregulatory effect on T cell activation.** J Immunol 159(12): 6070-6.
- Dunwiddie, T. V. y S. A. Masino (2001). **The role and regulation of adenosine in the central nervous system.** Annu Rev Neurosci 24: 31-55.
- Durroux, T. (2005). **Principles: a model for the allosteric interactions between ligand binding sites within a dimeric GPCR.** Trends Pharmacol Sci 26(7): 376-84.
- Elmer, G. I., J. O. Pieper, J. Levy, M. Rubinstein, M. J. Low, D. K. Grandy y R. A. Wise (2005). **Brain stimulation and morphine reward deficits in dopamine D2 receptor-deficient mice.** Psychopharmacology (Berl) 182(1): 33-44.
- Elsworth, J. D. y R. H. Roth (1997). **Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease.** Exp Neurol 144(1): 4-9.

- Encarnacion, E. V. y R. A. Hauser (2008). **Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: etiology, impact on quality of life, and treatments.** Eur Neurol 60(2): 57-66.
- Engel, M., T. Hoffmann, L. Wagner, M. Wermann, U. Heiser, R. Kiefersauer, R. Huber, W. Bode, H. U. Demuth y H. Brandstetter (2003). **The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism.** Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5063-8.
- Escrive, M., J. Burgueno, F. Ciruela, E. I. Canela, J. Mallol, C. Enrich, C. Lluís y R. Franco (2003). **Ligand-induced caveolae-mediated internalization of A1 adenosine receptors: morphological evidence of endosomal sorting and receptor recycling.** Exp Cell Res 285(1): 72-90.
- Everitt, B. J. y T. W. Robbins (2005). **Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion.** Nat Neurosci 8(11): 1481-9.
- Fahn, S. (2000). **The spectrum of levodopa-induced dyskinesias.** Ann Neurol 47(4 Suppl 1): S2-9; discussion S9-11.
- Farquhar-Smith, W. P., M. Egertova, E. J. Bradbury, S. B. McMahon, A. S. Rice y M. R. Elphick (2000). **Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord.** Mol Cell Neurosci 15(6): 510-21.
- Faure, M., T. A. Voyno-Yasenetskaya y H. R. Bourne (1994). **cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells.** J Biol Chem 269(11): 7851-4.
- Faure, S., L. I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V. L. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R. N. Germain y J. Delon (2004). **ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation.** Nat Immunol 5(3): 272-9.
- Feoktistov, I. y I. Biaggioni (1995). **Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma.** J Clin Invest 96(4): 1979-86.
- Ferguson, S. S. (2001). **Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.** Pharmacol Rev 53(1): 1-24.
- Ferrada, C., S. Ferre, V. Casado, A. Cortes, Z. Justinova, C. Barnes, E. I. Canela, S. R. Goldberg, R. Leurs, C. Lluís y R. Franco (2008). **Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function.** Neuropharmacology 55(2): 190-7.
- Ferrada, C., E. Moreno, V. Casado, G. Bongers, A. Cortes, J. Mallol, E. I. Canela, R. Leurs, S. Ferre, C. Lluís y R. Franco (2009). **Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors.** Br J Pharmacol 157(1): 64-75.
- Ferre, S., G. von Euler, B. Johansson, B. B. Fredholm y K. Fuxe (1991). **Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes.** Proc Natl Acad Sci U S A 88(16): 7238-41.
- Ferre, S. y K. Fuxe (1992). **Dopamine denervation leads to an increase in the intramembrane interaction between adenosine A2 and dopamine D2 receptors in the neostriatum.** Brain Res 594(1): 124-30.
- Ferre, S. (1997). **Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia.** Psychopharmacology (Berl) 133(2): 107-20.

- Ferre, S., M. Karcz-Kubicha, B. T. Hope, P. Popoli, J. Burgueno, M. A. Gutierrez, V. Casado, K. Fuxe, S. R. Goldberg, C. Lluís, R. Franco y F. Ciruela (2002). **Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function.** Proc Natl Acad Sci U S A 99(18): 11940-5.
- Ferre, S., F. Ciruela, M. Canals, D. Marcellino, J. Burgueno, V. Casado, J. Hillion, M. Torvinen, F. Fanelli, P. Benedetti Pd, S. R. Goldberg, M. Bouvier, K. Fuxe, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco y A. Woods (2004). **Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders.** Parkinsonism Relat Disord 10(5): 265-71.
- Ferre, S., F. Ciruela, A. S. Woods, C. Lluís y R. Franco (2007). **Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system.** Trends Neurosci 30(9): 440-6.
- Ferre, S., R. Baler, M. Bouvier, M. G. Caron, L. A. Devi, T. Durroux, K. Fuxe, S. R. George, J. A. Javitch, M. J. Lohse, K. Mackie, G. Milligan, K. D. Pflieger, J. P. Pin, N. D. Volkow, M. Waldhoer, A. S. Woods y R. Franco (2009). **Building a new conceptual framework for receptor heteromers.** Nat Chem Biol 5(3): 131-4.
- Ferre, S., G. Navarro, V. Casado, A. Cortes, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís y R. Franco (2010). **G protein-coupled receptor heteromers as new targets for drug development.** Prog Mol Biol Transl Sci 91: 41-52.
- Ferrua, F., I. Brigida y A. Aiuti (2010). **Update on gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency.** Curr Opin Allergy Clin Immunol 10(6): 551-6.
- Feyder, M., A. Bonito-Oliva y G. Fisone (2011). **L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission.** Front Behav Neurosci 5: 71.
- Fiorentini, C., C. Busi, E. Gorruso, C. Gotti, P. Spano y C. Missale (2008). **Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization.** Mol Pharmacol 74(1): 59-69.
- Flórez, J. a. A. P. (2003). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. Farmacología Humana. Barcelona, Masson 435-460.
- Flower, D. R. (1999). **Modelling G-protein-coupled receptors for drug design.** Biochim Biophys Acta 1422(3): 207-34.
- Foley, P., M. Gerlach, K. L. Double y P. Riederer (2004). **Dopamine receptor agonists in the therapy of Parkinson's disease.** J Neural Transm 111(10-11): 1375-446.
- Fontanilla, D., M. Johannessen, A. R. Hajipour, N. V. Cozzi, M. B. Jackson y A. E. Ruoho (2009). **The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator.** Science 323(5916): 934-7.
- Fontinha, B. M., J. M. Delgado-Garcia, N. Madronal, J. A. Ribeiro, A. M. Sebastiao y A. Gruart (2009). **Adenosine A(2A) receptor modulation of hippocampal CA3-CA1 synapse plasticity during associative learning in behaving mice.** Neuropsychopharmacology 34(7): 1865-74.
- Förster, T. (1948). **Intermolecular energy migration and fluorescence.** Ann. Phys 437(1-2): 55-75.
- Fotiadis, D., Y. Liang, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel y K. Palczewski (2003). **Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes.** Nature 421(6919): 127-8.

- Franco, R., V. Casado, F. Ciruela, J. Mallol, C. Lluís y E. I. Canela (1996). **The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A1 adenosine receptors.** Biochemistry 35(9): 3007-15.
- Franco, R., A. Valenzuela, C. Lluís y J. Blanco (1998). **Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes.** Immunol Rev 161: 27-42.
- Franco, R., M. Canals, D. Marcellino, S. Ferre, L. Agnati, J. Mallol, V. Casado, F. Ciruela, K. Fuxe, C. Lluís y E. I. Canela (2003). **Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering.** Trends Biochem Sci 28(5): 238-43.
- Franco, R., V. Casado, J. Mallol, S. Ferre, K. Fuxe, A. Cortes, F. Ciruela, C. Lluís y E. I. Canela (2005). **Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors.** Trends Biochem Sci 30(7): 360-6.
- Franco, R., V. Casado, J. Mallol, C. Ferrada, S. Ferre, K. Fuxe, A. Cortes, F. Ciruela, C. Lluís y E. I. Canela (2006). **The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers.** Mol Pharmacol 69(6): 1905-12.
- Franco, R., C. Lluís, E. I. Canela, J. Mallol, L. Agnati, V. Casado, F. Ciruela, S. Ferre y K. Fuxe (2007). **Receptor-receptor interactions involving adenosine A1 or dopamine D1 receptors and accessory proteins.** J Neural Transm 114(1): 93-104.
- Franco, R., V. Casado, A. Cortes, K. Perez-Capote, J. Mallol, E. Canela, S. Ferre y C. Lluís (2008a). **Novel pharmacological targets based on receptor heteromers.** Brain Res Rev 58(2): 475-82.
- Franco, R., V. Casado, A. Cortes, J. Mallol, F. Ciruela, S. Ferre, C. Lluís y E. I. Canela (2008b). **G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology.** Br J Pharmacol 153 Suppl 1: S90-8.
- Francois, C., C. Savy, C. Jan, D. Tande, E. C. Hirsch y J. Yelnik (2000). **Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients.** J Comp Neurol 425(1): 121-9.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J. W. Daly, T. K. Harden, K. A. Jacobson, P. Leff y M. Williams (1994). **Nomenclature and classification of purinoceptors.** Pharmacol Rev 46(2): 143-56.
- Fredholm, B. B., G. Arslan, L. Halldner, B. Kull, G. Schulte y W. Wasserman (2000). **Structure and function of adenosine receptors and their genes.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 362(4-5): 364-74.
- Fredholm, B. B., T. Hokfelt y G. Milligan (2007). **G-protein-coupled receptors: an update.** Acta Physiol (Oxf) 190(1): 3-7.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin y H. B. Schiöth (2003). **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** Mol Pharmacol 63(6): 1256-72.
- Freissmuth, M., W. Schutz y M. E. Linder (1991). **Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3.** J Biol Chem 266(27): 17778-83.
- Freund, T. F., I. Katona y D. Piomelli (2003). **Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.** Physiol Rev 83(3): 1017-66.
- Frick, L., R. Wolfenden, E. Smal y D. C. Baker (1986). **Transition-state stabilization by adenosine deaminase: structural studies of its inhibitory complex with deoxycoformycin.** Biochemistry 25(7): 1616-21.

- Fuentes, R., P. Petersson y M. A. Nicolelis (2010). **Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: mechanistic approach.** Eur J Neurosci 32(7): 1100-8.
- Fuxe, K., D. Marcellino, S. Genedani y L. Agnati (2007). **Adenosine A(2A) receptors, dopamine D(2) receptors and their interactions in Parkinson's disease.** Mov Disord 22(14): 1990-2017.
- Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, L. M. Bohn, R. J. Lefkowitz y M. G. Caron (2004). **Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions.** Annu Rev Neurosci 27: 107-44.
- Gandia, J., C. Lluís, S. Ferre, R. Franco y F. Ciruela (2008). **Light resonance energy transfer-based methods in the study of G protein-coupled receptor oligomerization.** Bioessays 30(1): 82-9.
- Gaoni, Y. y R. Mechoulam (1971). **The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish.** J Am Chem Soc 93(1): 217-24.
- García-Arencibia, M., C. García y J. Fernández-Ruiz (2009). **Cannabinoids and Parkinson's disease.** CNS Neurol Disord Drug Targets 8(6): 432-9.
- Gasca-Martínez, D., A. Hernández, A. Sierra, R. Valdósera, V. Anaya-Martínez, B. Florán, D. Erlij y J. Aceves (2010). **Dopamine inhibits GABA transmission from the globus pallidus to the thalamic reticular nucleus via presynaptic D4 receptors.** Neuroscience 169(4): 1672-81.
- Gaspar, H. B., A. Aiuti, F. Porta, F. Candotti, M. S. Hershfield y L. D. Notarangelo (2009). **How I treat ADA deficiency.** Blood 114(17): 3524-32.
- Gasser, T., B. Müller-Myhsok, Z. K. Wszolek, R. Oehlmann, D. B. Calne, V. Bonifati, B. Bereznoi, E. Fabrizio, P. Vieregge y R. D. Horstmann (1998). **A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13.** Nat Genet 18(3): 262-5.
- George, S. R., B. F. O'Dowd y S. P. Lee (2002). **G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery.** Nat Rev Drug Discov 1(10): 808-20.
- Gerdeman, G. L. y D. M. Lovinger (2003). **Emerging roles for endocannabinoids in long-term synaptic plasticity.** Br J Pharmacol 140(5): 781-9.
- Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. y D. R. Sibley (1990). **D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons.** Science 250(4986): 1429-32.
- Gerfen, C. R. y 445-508. (2004). **The Rat Nervous System.** Amsterdam.
- Gershon, A. A., T. Vishne y L. Grunhaus (2007). **Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response.** Biol Psychiatry 61(2): 145-53.
- Gerwins, P. y B. B. Fredholm (1992). **Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells.** Proc Natl Acad Sci U S A 89(16): 7330-4.
- Ghasemzadeh, M. B., L. C. Nelson, X. Y. Lu y P. W. Kalivas (1999). **Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment.** J Neurochem 72(1): 157-65.
- Gifford, A. N., Y. Tang, S. J. Gatley, N. D. Volkow, R. Lan y A. Makriyannis (1997). **Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices.** Neurosci Lett 238(1-2): 84-6.
- Gines, S., J. Hillion, M. Torvinen, S. Le Crom, V. Casado, E. I. Canela, S. Rondin, J. Y. Lew, S. Watson, M. Zoli, L. F. Agnati, P. Verniera, C. Lluís, S. Ferre, K. Fuxe y

- R. Franco (2000). **Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes.** Proc Natl Acad Sci U S A 97(15): 8606-11.
- Gines, S., F. Ciruela, J. Burgueno, V. Casado, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (2001). **Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line.** Mol Pharmacol 59(5): 1314-23.
- Giros, B., M. Jaber, S. R. Jones, R. M. Wightman y M. G. Caron (1996). **Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter.** Nature 379(6566): 606-12.
- Glass, M., J. M. Brotchie y Y. P. Manuef (1997). **Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia.** Eur J Neurosci 9(2): 199-203.
- Glass, M., M. Dragunow y R. L. Faull (1997). **Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain.** Neuroscience 77(2): 299-318.
- Goeders, N. E. y J. E. Smith (1983). **Cortical dopaminergic involvement in cocaine reinforcement.** Science 221(4612): 773-5.
- Golan, M., G. Schreiber y S. Avissar (2009). **Antidepressants, beta-arrestins and GRKs: from regulation of signal desensitization to intracellular multifunctional adaptor functions.** Curr Pharm Des 15(14): 1699-708.
- Gomes, I., B. A. Jordan, A. Gupta, C. Rios, N. Trapaidze y L. A. Devi (2001). **G protein coupled receptor dimerization: implications in modulating receptor function.** J Mol Med (Berl) 79(5-6): 226-42.
- Gonzalez-Maeso, J., R. L. Ang, T. Yuen, P. Chan, N. V. Weisstaub, J. F. Lopez-Gimenez, M. Zhou, Y. Okawa, L. F. Callado, G. Milligan, J. A. Gingrich, M. Filizola, J. J. Meana y S. C. Sealton (2008). **Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis.** Nature 452(7183): 93-7.
- Gottwald, M. D. y M. J. Aminoff **Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease.** Ann Neurol 69(6): 919-27.
- Gouldson, P. R., C. Higgs, R. E. Smith, M. K. Dean, G. V. Gkoutos y C. A. Reynolds (2000). **Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study.** Neuropsychopharmacology 23(4 Suppl): S60-77.
- Gracia, E., A. Cortes, J. J. Meana, J. Garcia-Sevilla, M. S. Herhsfield, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco y V. Casado (2008). **Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A(1) adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [H](R)-pia binding to the caudate nucleus.** J Neurochem 107(1): 161-70.
- Gracia, E., K. Perez-Capote, E. Moreno, J. Barksosva, J. Mallol, C. Lluís, R. Franco, A. Cortes, V. Casado y E. I. Canela (2011). **A2A adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase.** Biochem J 435(3): 701-9.
- Gudermann, T. S., T. Schultz, G. (1997). **Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors.** Annu Rev Neurosci 20: 399-427.
- Guigoni, C., I. Aubert, Q. Li, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, S. Ferry, U. Mach, H. Stark, L. Leriche, K. Hakansson, B. H. Bioulac, C. E. Gross, P. Sokoloff, G. Fisone, E. V. Gurevich, B. Bloch y E. Bezard (2005). **Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: focus on D1 and D3 dopamine receptors.** Parkinsonism Relat Disord 11 Suppl 1: S25-9.

- Guillin, O., J. Diaz, P. Carroll, N. Griffon, J. C. Schwartz y P. Sokoloff (2001). **BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization.** *Nature* 411(6833): 86-9.
- Guitart, X., X. Codony y X. Monroy (2004). **Sigma receptors: biology and therapeutic potential.** *Psychopharmacology (Berl)* 174(3): 301-19.
- Gustafsdottir, S. M., E. Schallmeiner, S. Fredriksson, M. Gullberg, O. Soderberg, M. Jarvius, J. Jarvius, M. Howell y U. Landegren (2005). **Proximity ligation assays for sensitive and specific protein analyses.** *Anal Biochem* 345(1): 2-9.
- Hao, J., M. A. Daleo, C. K. Murphy, P. B. Yu, J. N. Ho, J. Hu, R. T. Peterson, A. K. Hatzopoulos y C. C. Hong (2008). **Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells.** *PLoS One* 3(8): e2904.
- Hausdorff, W. P., M. Bouvier, B. F. O'Dowd, G. P. Irons, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1989). **Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization.** *J Biol Chem* 264(21): 12657-65.
- Havre, P. A., M. Abe, Y. Urasaki, K. Ohnuma, C. Morimoto y N. H. Dang (2008). **The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer.** *Front Biosci* 13: 1634-45.
- Hayashi, T. y T. P. Su (2001). **Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2): 491-6.
- Hayashi, T. y T. P. Su (2003). **Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 306(2): 726-33.
- Hayashi, T. y T. Su (2005). **The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology.** *Curr Neuropharmacol* 3(4): 267-80.
- He, L., J. Fong, M. von Zastrow y J. L. Whistler (2002). **Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization.** *Cell* 108(2): 271-82.
- Hebert, T. E., S. Moffett, J. P. Morello, T. P. Loisel, D. G. Bichet, C. Barret y M. Bouvier (1996). **A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation.** *J Biol Chem* 271(27): 16384-92.
- Heikkila, R. E., F. S. Cabbat y R. C. Duvoisin (1979). **Motor activity and rotational behavior after analogs of cocaine: correlation with dopamine uptake blockade.** *Commun Psychopharmacol* 3(5): 285-90.
- Hepler, J. R. y A. G. Gilman (1992). **G proteins.** *Trends Biochem Sci* 17(10): 383-7.
- Hermans, E., M. A. Vanisberg, M. Geurts y J. M. Maloteaux (1997). **Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons.** *Neurochem Int* 31(2): 291-9.
- Herrera, C., V. Casado, F. Ciruela, P. Schofield, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (2001). **Adenosine A2B receptors behave as an alternative anchoring protein for cell surface adenosine deaminase in lymphocytes and cultured cells.** *Mol Pharmacol* 59(1): 127-34.
- Herrick-Davis, K., E. Grinde y J. E. Mazurkiewicz (2004). **Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT2C receptor homodimers on the plasma membrane of living cells.** *Biochemistry* 43(44): 13963-71.
- Hershfield, M. S. (2003). **Genotype is an important determinant of phenotype in adenosine deaminase deficiency.** *Curr Opin Immunol* 15(5): 571-7.
- Hervouet, E., P. Hulin, F. M. Vallette y P. F. Cartron (2011). **Proximity ligation in situ assay for monitoring the global DNA methylation in cells.** *BMC Biotechnol* 11: 31.

- Hillion, J., M. Canals, M. Torvinen, V. Casado, R. Scott, A. Terasmaa, A. Hansson, S. Watson, M. E. Olah, J. Mallol, E. I. Canela, M. Zoli, L. F. Agnati, C. F. Ibanez, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre y K. Fuxe (2002). **Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors.** *J Biol Chem* 277(20): 18091-7.
- Hindle, J. V. (2010). **Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease.** *Age Ageing* 39(2): 156-61.
- Hirschberg, B. T. y M. I. Schimerlik (1994). **A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine m2 muscarinic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells.** *J Biol Chem* 269(42): 26127-35.
- Hirschhorn, R. y H. Ruddle (1983). **Genetic deficiencies of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase and their implications for therapy of leukemias.** *Curr Top Hematol* 4: 1-35.
- Hoehe, M. R., L. Caenazzo, M. M. Martinez, W. T. Hsieh, W. S. Modi, E. S. Gershon y T. I. Bonner (1991). **Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15.** *New Biol* 3(9): 880-5.
- Hove-Madsen, L., C. Prat-Vidal, A. Llach, F. Ciruela, V. Casado, C. Lluís, A. Bayes-Genis, J. Cinca y R. Franco (2006). **Adenosine A2A receptors are expressed in human atrial myocytes and modulate spontaneous sarcoplasmic reticulum calcium release.** *Cardiovasc Res* 72(2): 292-302.
- Howlett, A. C., M. Bidaut-Russell, W. A. Devane, L. S. Melvin, M. R. Johnson y M. Herkenham (1990). **The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization.** *Trends Neurosci* 13(10): 420-3.
- Hsieh, C., S. Brown, C. Derleth y K. Mackie (1999). **Internalization and recycling of the CB1 cannabinoid receptor.** *J Neurochem* 73(2): 493-501.
- Huang, C., J. R. Hepler, L. T. Chen, A. G. Gilman, R. G. Anderson y S. M. Mumby (1997). **Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane.** *Mol Biol Cell* 8(12): 2365-78.
- Hyman, S. E. (2007). **The neurobiology of addiction: implications for voluntary control of behavior.** *Am J Bioeth* 7(1): 8-11.
- Innamorati, G., C. Le Gouill, M. Balamotis y M. Birnbaumer (2001). **The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors.** *J Biol Chem* 276(16): 13096-103.
- Ito, C. (2004). **The role of the central histaminergic system on schizophrenia.** *Drug News Perspect* 17(6): 383-7.
- Jacoby, E., R. Bouhelal, M. Gerspacher y K. Seuwen (2006). **The 7 TM G-protein-coupled receptor target family.** *ChemMedChem* 1(8): 761-82.
- Jakowec, M. W. y G. M. Petzinger (2004). **1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned model of parkinson's disease, with emphasis on mice and nonhuman primates.** *Comp Med* 54(5): 497-513.
- Jan, C., C. Francois, D. Tande, J. Yelnik, L. Tremblay, Y. Agid y E. Hirsch (2000). **Dopaminergic innervation of the pallidum in the normal state, in MPTP-treated monkeys and in parkinsonian patients.** *Eur J Neurosci* 12(12): 4525-35.
- Jenner, P. (2008). **Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia.** *Nat Rev Neurosci* 9(9): 665-77.
- Jenner, P., A. Mori, R. Hauser, M. Morelli, B. B. Fredholm y J. F. Chen (2009). **Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease.** *Parkinsonism Relat Disord* 15(6): 406-13.

- Jin, W., S. Brown, J. P. Roche, C. Hsieh, J. P. Celver, A. Kover, C. Chavkin y K. Mackie (1999). **Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization.** *J Neurosci* 19(10): 3773-80.
- Jockers, R., S. Angers, A. Da Silva, P. Benaroch, A. D. Strosberg, M. Bouvier y S. Marullo (1999). **Beta(2)-adrenergic receptor down-regulation. Evidence for a pathway that does not require endocytosis.** *J Biol Chem* 274(41): 28900-8.
- Johansson, B., L. Halldner, T. V. Dunwiddie, S. A. Masino, W. Poelchen, L. Gimenez-Llort, R. M. Escorihuela, A. Fernandez-Teruel, Z. Wiesenfeld-Hallin, X. J. Xu, A. Hardemark, C. Betsholtz, E. Herlenius y B. B. Fredholm (2001). **Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9407-12.
- Jones, K. A., B. Borowsky, J. A. Tamm, D. A. Craig, M. M. Durkin, M. Dai, W. J. Yao, M. Johnson, C. Gunwaldsen, L. Y. Huang, C. Tang, Q. Shen, J. A. Salon, K. Morse, T. Laz, K. E. Smith, D. Nagarathnam, S. A. Noble, T. A. Branchek y C. Gerald (1998). **GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2.** *Nature* 396(6712): 674-9.
- Jordan, B. A. y L. A. Devi (1999). **G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function.** *Nature* 399(6737): 697-700.
- Jordan, B. A., N. Trapaidze, I. Gomes, R. Nivarthi y L. A. Devi (2001). **Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1): 343-8.
- Kajiyama, H., F. Kikkawa, E. Khin, K. Shibata, K. Ino y S. Mizutani (2003). **Dipeptidyl peptidase IV overexpression induces up-regulation of E-cadherin and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, resulting in decreased invasive potential in ovarian carcinoma cells.** *Cancer Res* 63(9): 2278-83.
- Kalivas, P. W. (2007). **Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy.** *Am J Addict* 16(2): 71-8.
- Kameoka, J., T. Tanaka, Y. Nojima, S. F. Schlossman y C. Morimoto (1993). **Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26.** *Science* 261(5120): 466-9.
- Kameoka, J., R. Ichinohasama, H. Inoue, J. Yamamoto, H. Yokoyama, Y. Tomiya, M. Yamada, K. Ishizawa, H. Harigae, T. Sawai y T. Sasaki (2006). **CD26, together with cell surface adenosine deaminase, is selectively expressed on ALK-positive, but not on ALK-negative, anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma.** *Leuk Lymphoma* 47(10): 2181-8.
- Kandel, E., J. Schwartz and T. Jessell y York. (2000). Principles of neural science. McGraw-Hill.
- Katona, I. y T. F. Freund (2008). **Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease.** *Nat Med* 14(9): 923-30.
- Kaupmann, K., B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin y B. Bettler (1998). **GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes.** *Nature* 396(6712): 683-7.
- Kearn, C. S., K. Blake-Palmer, E. Daniel, K. Mackie y M. Glass (2005). **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk?** *Mol Pharmacol* 67(5): 1697-704.

- Kelly, M. A., M. M. Vestling, C. M. Murphy, S. Hua, T. Sumpter y C. Fenselau (1996). **Primary structure of bovine adenosine deaminase.** J Pharm Biomed Anal 14(11): 1513-9.
- Kelly, E., C. P. Bailey y G. Henderson (2008). **Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization.** Br J Pharmacol 153 Suppl 1: S379-88.
- Kenakin, T. (2010). **G protein coupled receptors as allosteric proteins and the role of allosteric modulators.** J Recept Signal Transduct Res 30(5): 313-21.
- Khin, E. E., F. Kikkawa, K. Ino, H. Kajiyama, T. Suzuki, K. Shibata, K. Tamakoshi, T. Nagasaka y S. Mizutani (2003). **Dipeptidyl peptidase IV expression in endometrial endometrioid adenocarcinoma and its inverse correlation with tumor grade.** Am J Obstet Gynecol 188(3): 670-6.
- Kiesman, W. F., E. Elzein y J. Zablocki (2009). **A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers.** Handb Exp Pharmacol(193): 25-58.
- Kikkawa, F., H. Kajiyama, K. Ino, K. Shibata y S. Mizutani (2003). **Increased adhesion potency of ovarian carcinoma cells to mesothelial cells by overexpression of dipeptidyl peptidase IV.** Int J Cancer 105(6): 779-83.
- Kim, H. W., D. H. Roh, S. Y. Yoon, H. S. Seo, Y. B. Kwon, H. J. Han, K. W. Kim, A. J. Beitz y J. H. Lee (2008). **Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice.** Br J Pharmacol 154(5): 1125-34.
- Kinoshita, T., N. Nishio, I. Nakanishi, A. Sato y T. Fujii (2003). **Structure of bovine adenosine deaminase complexed with 6-hydroxy-1,6-dihydropurine riboside.** Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 59(Pt 2): 299-303.
- Kinoshita, T., I. Nakanishi, T. Terasaka, M. Kuno, N. Seki, M. Warizaya, H. Matsumura, T. Inoue, K. Takano, H. Adachi, Y. Mori y T. Fujii (2005). **Structural basis of compound recognition by adenosine deaminase.** Biochemistry 44(31): 10562-9.
- Kinoshita, T., T. Tada y I. Nakanishi (2008). **Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal.** Biochem Biophys Res Commun 373(1): 53-7.
- Kirik, D., C. Rosenblad y A. Bjorklund (1998). **Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat.** Exp Neurol 152(2): 259-77.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno y N. Shimizu (1998). **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.** Nature 392(6676): 605-8.
- Klein, D. C., M. J. Bailey, D. A. Carter, J. S. Kim, Q. Shi, A. K. Ho, C. L. Chik, P. Gaildrat, F. Morin, S. Ganguly, M. F. Rath, M. Moller, D. Sugden, Z. G. Rangel, P. J. Munson, J. L. Weller y S. L. Coon (2010). **Pineal function: impact of microarray analysis.** Mol Cell Endocrinol 314(2): 170-83.
- Klotz, K. N. y M. J. Lohse (1986). **The glycoprotein nature of A1 adenosine receptors.** Biochem Biophys Res Commun 140(1): 406-13.
- Knapp, C. M., M. M. Foye, N. Cottam, D. A. Ciraulo y C. Kornetsky (2001). **Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration.** Pharmacol Biochem Behav 68(4): 797-803.
- Koch, W. J., B. E. Hawes, L. F. Allen y R. J. Lefkowitz (1994). **Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras.** Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 12706-10.

- Koehler, L. H. y E. J. Benz (1962). **Serum adenosine deaminase: methodology and clinical applications.** *Clin Chem* 8: 133-40.
- Koeltzow, T. E., M. Xu, D. C. Cooper, X. T. Hu, S. Tonegawa, M. E. Wolf y F. J. White (1998). **Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice.** *J Neurosci* 18(6): 2231-8.
- Kolakowski, L. F., Jr. (1994). **GCRDb: a G-protein-coupled receptor database.** *Receptors Channels* 2(1): 1-7.
- Kong, M. M., A. Hasbi, M. Mattocks, T. Fan, B. F. O'Dowd y S. R. George (2007). **Regulation of D1 dopamine receptor trafficking and signaling by caveolin-1.** *Mol Pharmacol* 72(5): 1157-70.
- Konradi, C. (1998). **The molecular basis of dopamine and glutamate interactions in the striatum.** *Adv Pharmacol* 42: 729-33.
- Koob, G. F. (2006). The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* 101 23-30.
- Kravitz, A. V., B. S. Freeze, P. R. Parker, K. Kay, M. T. Thwin, K. Deisseroth y A. C. Kreitzer **Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry.** *Nature* 466(7306): 622-6.
- Krueger, K. M., Y. Daaka, J. A. Pitcher y R. J. Lefkowitz (1997). **The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification.** *J Biol Chem* 272(1): 5-8.
- Kruger, R., W. Kuhn, T. Muller, D. Woitalla, M. Graeber, S. Kosel, H. Przuntek, J. T. Epplen, L. Schols y O. Riess (1998). **Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.** *Nat Genet* 18(2): 106-8.
- Krupnick, J. G. y J. L. Benovic (1998). **The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 289-319.
- Kull, B., P. Svenningsson y B. B. Fredholm (2000). **Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum.** *Mol Pharmacol* 58(4): 771-7.
- Lanciego, J. L. y A. Vazquez (2012). **The basal ganglia and thalamus of the long-tailed macaque in stereotaxic coordinates. A template atlas based on coronal, sagittal and horizontal brain sections.** *Brain Struct Funct* 217(2): 613-66.
- Langer, S. Z. (1997). **25 years since the discovery of presynaptic receptors: present knowledge and future perspectives.** *Trends Pharmacol Sci* 18(3): 95-9.
- Larson, E. T., W. Deng, B. E. Krumm, A. Napuli, N. Mueller, W. C. Van Voorhis, F. S. Buckner, E. Fan, A. Lauricella, G. DeTitta, J. Luft, F. Zucker, W. G. Hol, C. L. Verlinde y E. A. Merritt (2008). **Structures of substrate- and inhibitor-bound adenosine deaminase from a human malaria parasite show a dramatic conformational change and shed light on drug selectivity.** *J Mol Biol* 381(4): 975-88.
- Laurier, L. G., W. A. Corrigan y S. R. George (1994). **Dopamine receptor density, sensitivity and mRNA levels are altered following self-administration of cocaine in the rat.** *Brain Res* 634(1): 31-40.
- Lee, F. J., S. Xue, L. Pei, B. Vukusic, N. Chery, Y. Wang, Y. T. Wang, H. B. Niznik, X. M. Yu y F. Liu (2002). **Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor.** *Cell* 111(2): 219-30.

- Leff, P. (1995). **The two-state model of receptor activation.** Trends Pharmacol Sci 16(3): 89-97.
- Lefkowitz, R. J. (1998). **G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization.** J Biol Chem 273(30): 18677-80.
- Lefkowitz, R. J. (2000). **The superfamily of heptahelical receptors.** Nat Cell Biol 2(7): E133-6.
- Lefkowitz, R. J. (2007). **Seven transmembrane receptors: something old, something new.** Acta Physiol (Oxf) 190(1): 9-19.
- Leroy, E., D. Anastasopoulos, S. Konitsiotis, C. Lavedan y M. H. Polymeropoulos (1998). **Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease.** Hum Genet 103(4): 424-7.
- Levesque, M. y A. Parent (2005). **The striatofugal fiber system in primates: a reevaluation of its organization based on single-axon tracing studies.** Proc Natl Acad Sci U S A 102(33): 11888-93.
- Lewis, S. J., M. A. Caldwell y R. A. Barker (2003). **Modern therapeutic approaches in Parkinson's disease.** Expert Rev Mol Med 5(10): 1-20.
- Limbird, L. E., P. D. Meyers y R. J. Lefkowitz (1975). **Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity.** Biochem Biophys Res Commun 64(4): 1160-8.
- Lin, R., K. Karpa, N. Kabbani, P. Goldman-Rakic y R. Levenson (2001). **Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A.** Proc Natl Acad Sci U S A 98(9): 5258-63.
- Lin, S. H. y O. Civelli (2004). **Orphan G protein-coupled receptors: targets for new therapeutic interventions.** Ann Med 36(3): 204-14.
- Little, K. Y., J. A. Kirkman, F. I. Carroll, G. R. Breese y G. E. Duncan (1993). **[125I]RTI-55 binding to cocaine-sensitive dopaminergic and serotonergic uptake sites in the human brain.** J Neurochem 61(6): 1996-2006.
- Liu, X. Y., X. P. Chu, L. M. Mao, M. Wang, H. X. Lan, M. H. Li, G. C. Zhang, N. K. Parekar, E. E. Fibuch, M. Haines, K. A. Neve, F. Liu, Z. G. Xiong y J. Q. Wang (2006). **Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine.** Neuron 52(5): 897-909.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1990). **Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors.** J Biol Chem 265(6): 3202-11.
- Londos, C., D. M. Cooper y J. Wolff (1980). **Subclasses of external adenosine receptors.** Proc Natl Acad Sci U S A 77(5): 2551-4.
- Longordo, F., C. Kopp y A. Luthi (2009). **Consequences of sleep deprivation on neurotransmitter receptor expression and function.** Eur J Neurosci 29(9): 1810-9.
- Lundstrom, K. (2006). **Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors.** Curr Protein Pept Sci 7(5): 465-70.
- Luo, Z., N. D. Volkow, N. Heintz, Y. Pan y C. Du (2011). **Acute cocaine induces fast activation of D1 receptor and progressive deactivation of D2 receptor striatal neurons: in vivo optical microprobe [Ca²⁺]_i imaging.** J Neurosci 31(37): 13180-90.
- Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1999). **Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes.** Science 283(5402): 655-61.

- MacDonald, R. L., J. H. Skerritt y M. A. Werz (1986). **Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture.** *J Physiol* 370: 75-90.
- Maggio, R., Z. Vogel y J. Wess (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(7): 3103-7.
- Maggio, R., M. Scarselli, F. Novi, M. J. Millan y G. U. Corsini (2003). **Potent activation of dopamine D3/D2 heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole.** *J Neurochem* 87(3): 631-41.
- Maia, L. y A. de Mendonca (2002). **Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease?** *Eur J Neurol* 9(4): 377-82.
- Mailleux, P. y J. J. Vanderhaeghen (1992). **Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons.** *Neurosci Lett* 148(1-2): 173-6.
- Maldonado, R., J. A. Blendy, E. Tzavara, P. Gass, B. P. Roques, J. Hanoune y G. Schutz (1996). **Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB.** *Science* 273(5275): 657-9.
- Malkus, K. A., E. Tsika y H. Ischiropoulos (2009). **Oxidative modifications, mitochondrial dysfunction, and impaired protein degradation in Parkinson's disease: how neurons are lost in the Bermuda triangle.** *Mol Neurodegener* 4: 24.
- Manzoni, O., D. Pujalte, J. Williams y J. Bockaert (1998). **Decreased presynaptic sensitivity to adenosine after cocaine withdrawal.** *J Neurosci* 18(19): 7996-8002.
- Marcellino, D., D. C. Roberts, G. Navarro, M. Filip, L. Agnati, C. Lluís, R. Franco y K. Fuxe (2007). **Increase in A2A receptors in the nucleus accumbens after extended cocaine self-administration and its disappearance after cocaine withdrawal.** *Brain Res* 1143: 208-20.
- Marcellino, D., S. Ferre, V. Casado, A. Cortes, B. Le Foll, C. Mazzola, F. Drago, O. Saur, H. Stark, A. Soriano, C. Barnes, S. R. Goldberg, C. Lluís, K. Fuxe y R. Franco (2008). **Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum.** *J Biol Chem* 283(38): 26016-25.
- Margeta-Mitrovic, M., Y. N. Jan y L. Y. Jan (2000). **A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization.** *Neuron* 27(1): 97-106.
- Marianayagam, N. J., M. Sunde y J. M. Matthews (2004). **The power of two: protein dimerization in biology.** *Trends Biochem Sci* 29(11): 618-25.
- Marinissen, M. J. y J. S. Gutkind (2001). **G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.** *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 368-76.
- Martin, W. R., C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler y P. E. Gilbert (1976). **The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog.** *J Pharmacol Exp Ther* 197(3): 517-32.
- Martin, C., M. Leone, X. Viviani, M. L. Ayem y R. Guieu (2000). **High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock.** *Crit Care Med* 28(9): 3198-202.
- Martinez, D., A. Broft, R. W. Foltin, M. Slifstein, D. R. Hwang, Y. Huang, A. Perez, W. G. Frankle, T. Cooper, H. D. Kleber, M. W. Fischman y M. Laruelle (2004). **Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional**

- subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior.** *Neuropsychopharmacology* 29(6): 1190-202.
- Martinez, D., M. Slifstein, R. Narendran, R. W. Foltin, A. Broft, D. R. Hwang, A. Perez, A. Abi-Dargham, M. W. Fischman, H. D. Kleber y M. Laruelle (2009). **Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine.** *Neuropsychopharmacology* 34(7): 1774-82.
- Martinez-Navio, J. M., N. Climent, R. Pacheco, F. Garcia, M. Plana, M. Nomdedeu, H. Oliva, C. Rovira, L. Miralles, J. M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (2009). **Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation.** *Immunology* 128(3): 393-404.
- Martinez-Pinilla, E., I. Reyes-Resina, A. Onatibia-Astibia, M. Zamarbide, A. Ricobaraza, G. Navarro, E. Moreno, I. G. Dopeso-Reyes, S. Sierra, A. J. Rico, E. Roda, J. L. Lanciego y R. Franco (2014). **CB and GPR55 receptors are co-expressed and form heteromers in rat and monkey striatum.** *Exp Neurol* 261C: 44-52.
- Massinen, S., K. Tammimies, I. Tapia-Paez, H. Matsson, M. E. Hokkanen, O. Soderberg, U. Landegren, E. Castren, J. A. Gustafsson, E. Treuter y J. Kere (2009). **Functional interaction of DYX1C1 with estrogen receptors suggests involvement of hormonal pathways in dyslexia.** *Hum Mol Genet* 18(15): 2802-12.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young y T. I. Bonner (1990). **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature* 346(6284): 561-4.
- Matsumoto, R. R., K. L. Hewett, B. Pouw, W. D. Bowen, S. M. Husbands, J. J. Cao y A. Hauck Newman (2001). **Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters.** *Neuropharmacology* 41(7): 878-86.
- Matsumoto, R. R., K. A. McCracken, M. J. Friedman, B. Pouw, B. R. De Costa y W. D. Bowen (2001). **Conformationally restricted analogs of BD1008 and an antisense oligodeoxynucleotide targeting sigma1 receptors produce anti-cocaine effects in mice.** *Eur J Pharmacol* 419(2-3): 163-74.
- Matsumoto, R. R., K. A. McCracken, B. Pouw, Y. Zhang y W. D. Bowen (2002). **Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides.** *Neuropharmacology* 42(8): 1043-55.
- Matsumoto, R. R., Y. Liu, M. Lerner, E. W. Howard y D. J. Brackett (2003). **Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents.** *Eur J Pharmacol* 469(1-3): 1-12.
- Matsumoto, R. R., D. L. Gilmore, B. Pouw, W. D. Bowen, W. Williams, A. Kausar y A. Coop (2004). **Novel analogs of the sigma receptor ligand BD1008 attenuate cocaine-induced toxicity in mice.** *Eur J Pharmacol* 492(1): 21-6.
- Matsumoto, R. R., B. Pouw, A. L. Mack, A. Daniels y A. Coop (2007). **Effects of UMB24 and (+/-)-SM 21, putative sigma2-preferring antagonists, on behavioral toxic and stimulant effects of cocaine in mice.** *Pharmacol Biochem Behav* 86(1): 86-91.
- Mattera, R., B. J. Pitts, M. L. Entman y L. Birnbaumer (1985). **Guanine nucleotide regulation of a mammalian myocardial muscarinic receptor system. Evidence for homo- and heterotropic cooperativity in ligand binding analyzed by computer-assisted curve fitting.** *J Biol Chem* 260(12): 7410-21.

- Maurel, F., H. Lilliu y C. Le Pen (2001). **[Social and economic cost of L-Dopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease]**. Rev Neurol (Paris) 157(5): 507-14.
- McVey, M., D. Ramsay, E. Kellett, S. Rees, S. Wilson, A. J. Pope y G. Milligan (2001). **Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy.** J Biol Chem 276(17): 14092-9.
- Meador-Woodruff, J. H., K. Y. Little, S. P. Damask, A. Mansour y S. J. Watson (1993). **Effects of cocaine on dopamine receptor gene expression: a study in the postmortem human brain.** Biol Psychiatry 34(6): 348-55.
- Mechoulam, R. y Y. Gaoni (1965). **Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids.** Tetrahedron 21(5): 1223-9.
- Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton y et al. (1995). **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** Biochem Pharmacol 50(1): 83-90.
- Meiergerd, S. M., T. A. Patterson y J. O. Schenk (1993). **D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo.** J Neurochem 61(2): 764-7.
- Menkel, M., P. Terry, M. Pontecorvo, J. L. Katz y J. M. Witkin (1991). **Selective sigma ligands block stimulant effects of cocaine.** Eur J Pharmacol 201(2-3): 251-2.
- Mercuri, N. B., A. Saiardi, A. Bonci, R. Picetti, P. Calabresi, G. Bernardi y E. Borrelli (1997). **Loss of autoreceptor function in dopaminergic neurons from dopamine D2 receptor deficient mice.** Neuroscience 79(2): 323-7.
- Miczek, K. A. y H. Yoshimura (1982). **Disruption of primate social behavior by d-amphetamine and cocaine: differential antagonism by antipsychotics.** Psychopharmacology (Berl) 76(2): 163-71.
- Milligan, G. (2006). **G-protein-coupled receptor heterodimers: pharmacology, function and relevance to drug discovery.** Drug Discov Today 11(11-12): 541-9.
- Milligan, G. (2007). **G protein-coupled receptor dimerisation: molecular basis and relevance to function.** Biochim Biophys Acta 1768(4): 825-35.
- Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber y M. G. Caron (1998). **Dopamine receptors: from structure to function.** Physiol Rev 78(1): 189-225.
- Miyahara, S., Komori, T., Shizuya, K. and Nomura (1998). **Changes of serum adenosine deaminase activity induced by stress in rats.** J. Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp. 13(5): 325-327.
- Miyazono, K., Y. Kamiya y M. Morikawa (2010). **Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction.** J Biochem 147(1): 35-51.
- Mohamedali, K. A., L. C. Kurz y F. B. Rudolph (1996). **Site-directed mutagenesis of active site glutamate-217 in mouse adenosine deaminase.** Biochemistry 35(5): 1672-80.
- Monassier, L. y P. Bousquet (2002). **Sigma receptors: from discovery to highlights of their implications in the cardiovascular system.** Fundam Clin Pharmacol 16(1): 1-8.
- Moore, K. E. y G. A. Gudelsky (1977). **Drug actions on dopamine turnover in the median eminence.** Adv Biochem Psychopharmacol 16: 227-35.

- Moore, R. J., S. L. Vinsant, M. A. Nader, L. J. Porrino y D. P. Friedman (1998). **Effect of cocaine self-administration on striatal dopamine D1 receptors in rhesus monkeys.** *Synapse* 28(1): 1-9.
- Moreau, J. L. y G. Huber (1999). **Central adenosine A(2A) receptors: an overview.** *Brain Res Brain Res Rev* 31(1): 65-82.
- Moreno, E., S. H. Vaz, N. S. Cai, C. Ferrada, C. Quiroz, S. K. Barodia, N. Kabbani, E. I. Canela, P. J. McCormick, C. Lluís, R. Franco, J. A. Ribeiro, A. M. Sebastiao y S. Ferre (2011a). **Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus.** *J Neurosci* 31(20): 7412-23.
- Moreno, E., H. Hoffmann, M. Gonzalez-Sepulveda, G. Navarro, V. Casado, A. Cortes, J. Mallol, M. Vignes, P. J. McCormick, E. I. Canela, C. Lluís, R. Moratalla, S. Ferre, J. Ortiz y R. Franco (2011b). **Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway.** *J Biol Chem* 286(7): 5846-54.
- Morgan, D., K. Brebner, W. J. Lynch y D. C. Roberts (2002). **Increases in the reinforcing efficacy of cocaine after particular histories of reinforcement.** *Behav Pharmacol* 13(5-6): 389-96.
- Morgan, D., K. A. Grant, H. D. Gage, R. H. Mach, J. R. Kaplan, O. Prioleau, S. H. Nader, N. Buchheimer, R. L. Ehrenkaufner y M. A. Nader (2002). **Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration.** *Nat Neurosci* 5(2): 169-74.
- Mortensen, O. V. y S. G. Amara (2003). **Dynamic regulation of the dopamine transporter.** *Eur J Pharmacol* 479(1-3): 159-70.
- Moser, E., J. Kargl, J. L. Whistler, M. Waldhoer y P. Tschische (2010). **G protein-coupled receptor-associated sorting protein 1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G protein-coupled receptors.** *Pharmacology* 86(1): 22-9.
- Muller, C. E. y S. Ferre (2007). **Blocking striatal adenosine A2A receptors: a new strategy for basal ganglia disorders.** *Recent Pat CNS Drug Discov* 2(1): 1-21.
- Munshi, R., I. H. Pang, P. C. Sternweis y J. Linden (1991). **A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go.** *J Biol Chem* 266(33): 22285-9.
- Nader, M. A., J. B. Daunais, T. Moore, S. H. Nader, R. J. Moore, H. R. Smith, D. P. Friedman y L. J. Porrino (2002). **Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure.** *Neuropsychopharmacology* 27(1): 35-46.
- Nader, M. A., D. Morgan, H. D. Gage, S. H. Nader, T. L. Calhoun, N. Buchheimer, R. Ehrenkaufner y R. H. Mach (2006). **PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys.** *Nat Neurosci* 9(8): 1050-6.
- Nakamachi, Y., M. Koshiba, T. Nakazawa, S. Hatachi, R. Saura, M. Kurosaka, H. Kusaka y S. Kumagai (2003). **Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 48(3): 668-74.
- Nakazi, M., U. Bauer, T. Nickel, M. Kathmann y E. Schlicker (2000). **Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361(1): 19-24.
- Navarro, G., P. Carriba, J. Gandia, F. Ciruela, V. Casado, A. Cortes, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís y R. Franco (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: 1088-97.
- Navarro, G., M. S. Aymerich, D. Marcellino, A. Cortes, V. Casado, J. Mallol, E. I. Canela, L. Agnati, A. S. Woods, K. Fuxe, C. Lluís, J. L. Lanciego, S. Ferre y R. Franco (2009). **Interactions between calmodulin, adenosine A2A, and dopamine D2 receptors.** *J Biol Chem* 284(41): 28058-68.
- Navarro, G., E. Moreno, M. Aymerich, D. Marcellino, P. J. McCormick, J. Mallol, A. Cortes, V. Casado, E. I. Canela, J. Ortiz, K. Fuxe, C. Lluís, S. Ferre y R. Franco (2010a). **Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43): 18676-81.
- Navarro, G., S. Ferre, A. Cordomi, E. Moreno, J. Mallol, V. Casado, A. Cortes, H. Hoffmann, J. Ortiz, E. I. Canela, C. Lluís, L. Pardo, R. Franco y A. S. Woods (2010b). **Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers.** *J Biol Chem* 285(35): 27346-59.
- Nayak, P. K., A. L. Misra y S. J. Mule (1976). **Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats.** *J Pharmacol Exp Ther* 196(3): 556-69.
- Neubig, R. R., M. Spedding, T. Kenakin y A. Christopoulos (2003). **International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology.** *Pharmacol Rev* 55(4): 597-606.
- Neve, K. A., J. K. Seamans y H. Trantham-Davidson (2004). **Dopamine receptor signaling.** *J Recept Signal Transduct Res* 24(3): 165-205.
- Ng, G. Y., G. Varghese, H. T. Chung, J. Trogadis, P. Seeman, B. F. O'Dowd y S. R. George (1997). **Resistance of the dopamine D2L receptor to desensitization accompanies the up-regulation of receptors on to the surface of Sf9 cells.** *Endocrinology* 138(10): 4199-206.
- Nicola, S. M., J. Surmeier y R. C. Malenka (2000). **Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens.** *Annu Rev Neurosci* 23: 185-215.
- Nie, J. y D. L. Lewis (2001a). **The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling.** *Neuroscience* 107(1): 161-7.
- Nie, J. y D. L. Lewis (2001b). **Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration.** *J Neurosci* 21(22): 8758-64.
- Nieouillon, A. y M. Amalric (2002). **[Dopaminergic receptors: structural features and functional implications].** *Rev Neurol (Paris)* 158 Spec no 1: S59-68.
- Nishizawa, T., Y. Nishida, I. Akaoka y T. Yoshimura (1975). **Erythrocyte adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activity in gout.** *Clin Chim Acta* 58(3): 277-82.
- Noble, E. P., S. T. St Jeor, T. Ritchie, K. Syndulko, S. C. St Jeor, R. J. Fitch, R. L. Brunner y R. S. Sparkes (1994). **D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene?** *Med Hypotheses* 42(4): 257-60.
- Norstrand, I. F. (1987). **Adenosine deaminase in blood cells in various neurological conditions.** *Br J Haematol* 65(2): 254-6.

- Nutt, J. G. (1990). **Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations.** *Neurology* 40(2): 340-5.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, M. Rodriguez, J. L. Lanciego, J. Artieda, N. Gonzalo y C. W. Olanow (2000). **Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease.** *Trends Neurosci* 23(10 Suppl): S8-19.
- Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin y M. Rodriguez (2008). **Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease.** *Mov Disord* 23 Suppl 3: S548-59.
- Obeso, J. A. y J. L. Lanciego (2011). **Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia.** *Front Neuroanat* 5: 39.
- Okusa, M. D. (2002). **A(2A) adenosine receptor: a novel therapeutic target in renal disease.** *Am J Physiol Renal Physiol* 282(1): F10-8.
- Orgado, J. M., J. Fernandez-Ruiz y J. Romero (2009). **The endocannabinoid system in neuropathological states.** *Int Rev Psychiatry* 21(2): 172-80.
- Orru, M., J. Bakesova, M. Brugarolas, C. Quiroz, V. Beaumont, S. R. Goldberg, C. Lluís, A. Cortes, R. Franco, V. Casado, E. I. Canela y S. Ferre (2011). **Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A(2A) receptor antagonists.** *PLoS One* 6(1): e16088.
- Ostrom, R. S. y P. A. Insel (2004). **The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology.** *Br J Pharmacol* 143(2): 235-45.
- Pacheco, R., J. M. Martinez-Navio, M. Lejeune, N. Climent, H. Oliva, J. M. Gatell, T. Gallart, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (2005). **CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27): 9583-8.
- Pak, Y., B. F. O'Dowd, J. B. Wang y S. R. George (1999). **Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase.** *J Biol Chem* 274(39): 27610-6.
- Palmer, T. M., T. W. Gettys, K. A. Jacobson y G. L. Stiles (1994). **Desensitization of the canine A2a adenosine receptor: delineation of multiple processes.** *Mol Pharmacol* 45(6): 1082-94.
- Palmer, T. M., T. W. Gettys y G. L. Stiles (1995). **Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor.** *J Biol Chem* 270(28): 16895-902.
- Pani, L. (2002). **Clinical implications of dopamine research in schizophrenia.** *Curr Med Res Opin* 18 Suppl 3: s3-7.
- Parolaro, D. y T. Rubino (2002). **Is cannabinoid transmission involved in rewarding properties of drugs of abuse?** *Br J Pharmacol* 136(8): 1083-4.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.**
- Perry, S. J. y R. J. Lefkowitz (2002). **Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation.** *Trends Cell Biol* 12(3): 130-8.
- Pertwee, R. G. (1997). **Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors.** *Pharmacol Ther* 74(2): 129-80.
- Pertwee, R. G. (2007). **GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan?** *Br J Pharmacol* 152(7): 984-6.
- Petersen, M. B., L. Tranebjaerg, N. Tommerup, P. Nygaard y H. Edwards (1987). **New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13 X**

- 11 by study of a patient with interstitial deletion 20q.** *J Med Genet* 24(2): 93-6.
- Pfleger, K. D. y K. A. Eidne (2005). **Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells.** *Biochem J* 385(Pt 3): 625-37.
- Pfleger, K. D., M. B. Dalrymple, J. R. Dromey y K. A. Eidne (2007). **Monitoring interactions between G-protein-coupled receptors and beta-arrestins.** *Biochem Soc Trans* 35(Pt 4): 764-6.
- Phillis, J. W., J. P. Edstrom, G. K. Kostopoulos y J. R. Kirkpatrick (1979). **Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex.** *Can J Physiol Pharmacol* 57(11): 1289-312.
- Piccini, P., D. J. Burn, R. Ceravolo, D. Maraganore y D. J. Brooks (1999). **The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins.** *Ann Neurol* 45(5): 577-82.
- Pierce, A., M. Lyon, I. N. Hampson, G. J. Cowling y J. T. Gallagher (1992). **Molecular cloning of the major cell surface heparan sulfate proteoglycan from rat liver.** *J Biol Chem* 267(6): 3894-900.
- Pierce, K. L. y R. J. Lefkowitz (2001). **Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors.** *Nat Rev Neurosci* 2(10): 727-33.
- Pin, J. P., R. Neubig, M. Bouvier, L. Devi, M. Filizola, J. A. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, K. Palczewski, M. Parmentier y M. Spedding (2007). **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers.** *Pharmacol Rev* 59(1): 5-13.
- Pinna, A., G. di Chiara, J. Wardas y M. Morelli (1996). **Blockade of A2a adenosine receptors positively modulates turning behaviour and c-Fos expression induced by D1 agonists in dopamine-denervated rats.** *Eur J Neurosci* 8(6): 1176-81.
- Pinna, A. (2009). **Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease.** *Expert Opin Investig Drugs* 18(11): 1619-31.
- Pippig, S., S. Andexinger y M. J. Lohse (1995). **Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization.** *Mol Pharmacol* 47(4): 666-76.
- Piras, M. A., C. Gakis, M. Budroni y G. Andreoni (1978). **Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis.** *Br Med J* 2(6154): 1751-2.
- Pollack, A. E. y J. S. Fink (1996). **Synergistic interaction between an adenosine antagonist and a D1 dopamine agonist on rotational behavior and striatal c-Fos induction in 6-hydroxydopamine-lesioned rats.** *Brain Res* 743(1-2): 124-30.
- Popoli, P. (2008). **Regulation of brain functions by A2A receptors: implication for therapeutics.** *Curr Pharm Des* 14(15): 1466-7.
- Popoli, P., D. Blum, M. R. Domenici, S. Burnouf y Y. Chern (2008). **A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease.** *Curr Pharm Des* 14(15): 1500-11.
- Prinster, S. C., C. Hague y R. A. Hall (2005). **Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance.** *Pharmacol Rev* 57(3): 289-98.

- Puzianowska-Kuznicka, M. y J. Kuznicki (2009). **The ER and ageing II: calcium homeostasis.** *Ageing Res Rev* 8(3): 160-72.
- Ralevic, V. y G. Burnstock (1998). **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacol Rev* 50(3): 413-92.
- Ramkumar, V., M. E. Olah, K. A. Jacobson y G. L. Stiles (1991). **Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells.** *Mol Pharmacol* 40(5): 639-47.
- Rankin, M. L., L. A. Hazelwood, R. B. Free, Y. Namkung, E. B. Rex, R. A. Roof and D. R. Sibley (2010). Molecular pharmacology of the dopamine receptors. *Dopamine Handbook*. D. S. Iversen LL, Iversen SD, Bjorklund A ed. New York, Oxford University: 63-87.
- Ravna, A. W., I. Sylte y S. G. Dahl (2009). **Structure and localisation of drug binding sites on neurotransmitter transporters.** *J Mol Model* 15(10): 1155-64.
- Reggio, R., A. Pezzola y P. Popoli (1999). **The intrastriatal injection of an adenosine A(2) receptor antagonist prevents frontal cortex EEG abnormalities in a rat model of Huntington's disease.** *Brain Res* 831(1-2): 315-8.
- Reiter, E., S. Ahn, A. K. Shukla y R. J. Lefkowitz (2012). **Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 179-97.
- Renfrow, J. J., A. C. Scheck, N. S. Dhawan, P. J. Lukac, H. Vogel, J. P. Chandler, J. J. Raizer, G. R. Harsh, A. Chakravarti y M. Bredel (2011). **Gene-protein correlation in single cells.** *Neuro Oncol* 13(8): 880-5.
- Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao y A. de Mendonca (2002). **Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications.** *Prog Neurobiol* 68(6): 377-92.
- Ribeiro, J. A., A. M. Sebastiao y A. de Mendonca (2003). **Participation of adenosine receptors in neuroprotection.** *Drug News Perspect* 16(2): 80-6.
- Ribeiro, J. A. y A. M. Sebastiao (2010). **Caffeine and adenosine.** *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 1: S3-15.
- Ribera, E., J. M. Martinez-Vazquez, I. Ocana, R. M. Segura y C. Pascual (1987). **Activity of adenosine deaminase in cerebrospinal fluid for the diagnosis and follow-up of tuberculous meningitis in adults.** *J Infect Dis* 155(4): 603-7.
- Richard, E., F. X. Arredondo-Vega, I. Santisteban, S. J. Kelly, D. D. Patel y M. S. Hershfield (2000). **The binding site of human adenosine deaminase for CD26/Dipeptidyl peptidase IV: the Arg142Gln mutation impairs binding to cd26 but does not cause immune deficiency.** *J Exp Med* 192(9): 1223-36.
- Richard, E., S. M. Alam, F. X. Arredondo-Vega, D. D. Patel y M. S. Hershfield (2002). **Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV.** *J Biol Chem* 277(22): 19720-6.
- Richman, J. G., A. E. Brady, Q. Wang, J. L. Hensel, R. J. Colbran y L. E. Limbird (2001). **Agonist-regulated Interaction between alpha2-adrenergic receptors and spinophilin.** *J Biol Chem* 276(18): 15003-8.
- Rietschel, M., H. Krauss, D. J. Muller, T. G. Schulze, M. Knapp, K. Marwinski, A. O. Maroldt, S. Paus, F. Grunhage, P. Propping, W. Maier, T. Held y M. M. Nothen (2000). **Dopamine D3 receptor variant and tardive dyskinesia.** *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250(1): 31-5.

- Rios, C. D., B. A. Jordan, I. Gomes y L. A. Devi (2001). **G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function.** *Pharmacol Ther* 92(2-3): 71-87.
- Risinger, F. O., P. A. Freeman, M. Rubinstein, M. J. Low y D. K. Grandy (2000). **Lack of operant ethanol self-administration in dopamine D2 receptor knockout mice.** *Psychopharmacology (Berl)* 152(3): 343-50.
- Ritter, S. L. y R. A. Hall (2009). **Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(12): 819-30.
- Ritz, M. C., R. J. Lamb, S. R. Goldberg y M. J. Kuhar (1987). **Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine.** *Science* 237(4819): 1219-23.
- Rivers, J. R. y J. C. Ashton (2010). **The development of cannabinoid CB1 receptor agonists for the treatment of central neuropathies.** *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 10(1): 47-64.
- Rivkees, S. A. (1995). **The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats.** *Brain Res Dev Brain Res* 89(2): 202-13.
- Rivkees, S. A., H. Barbhuiya y I. J. AP (1999). **Identification of the adenine binding site of the human A1 adenosine receptor.** *J Biol Chem* 274(6): 3617-21.
- Robbins, M. J., F. Ciruela, A. Rhodes y R. A. McIlhinney (1999). **Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha.** *J Neurochem* 72(6): 2539-47.
- Roberts, D. C., M. E. Corcoran y H. C. Fibiger (1977). **On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine.** *Pharmacol Biochem Behav* 6(6): 615-20.
- Robinson, T. E. y B. Kolb (1999). **Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine.** *Eur J Neurosci* 11(5): 1598-604.
- Robinson, T. E., G. Gorny, E. Mitton y B. Kolb (2001). **Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex.** *Synapse* 39(3): 257-66.
- Roche, K. W., J. C. Tu, R. S. Petralia, B. Xiao, R. J. Wenthold y P. F. Worley (1999). **Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors.** *J Biol Chem* 274(36): 25953-7.
- Rocheville, M., D. C. Lange, U. Kumar, R. Sasi, R. C. Patel y Y. C. Patel (2000). **Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers.** *J Biol Chem* 275(11): 7862-9.
- Romano, C., W. L. Yang y K. L. O'Malley (1996). **Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer.** *J Biol Chem* 271(45): 28612-6.
- Romano, C., J. K. Miller, K. Hyrc, S. Dikranian, S. Mennerick, Y. Takeuchi, M. P. Goldberg y K. L. O'Malley (2001). **Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization.** *Mol Pharmacol* 59(1): 46-53.
- Romieu, P., R. Martin-Fardon y T. Maurice (2000). **Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference.** *Neuroreport* 11(13): 2885-8.
- Romieu, P., V. L. Phan, R. Martin-Fardon y T. Maurice (2002). **Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade.** *Neuropsychopharmacology* 26(4): 444-55.

- Rondou, P., G. Haegeman y K. Van Craenenbroeck (2010). **The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties.** *Cell Mol Life Sci* 67(12): 1971-86.
- Rosenbaum, D. M., S. G. Rasmussen y B. K. Kobilka (2009). **The structure and function of G-protein-coupled receptors.** *Nature* 459(7245): 356-63.
- Ross, S. B. y A. L. Renyi (1967). **Inhibition of the uptake of tritiated catecholamines by antidepressant and related agents.** *Eur J Pharmacol* 2(3): 181-6.
- Rouge-Pont, F., A. Usiello, M. Benoit-Marand, F. Gonon, P. V. Piazza y E. Borrelli (2002). **Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D2 receptors.** *J Neurosci* 22(8): 3293-301.
- Rozenfeld, R., F. M. Décaillot, A. P. IJzerman and L. A. Devi (2006). **Heterodimers of G protein-coupled receptors as novel and distinct drug targets.** *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3(4): 437-43.
- Rozenfeld, R. y L. A. Devi (2010). **Receptor heteromerization and drug discovery.** *Trends Pharmacol Sci* 31(3): 124-30.
- Rozenfeld, R. y L. A. Devi (2011). **Exploring a role for heteromerization in GPCR signalling specificity.** *Biochem J* 433(1): 11-8.
- Rubino, T., D. Vigano, F. Premoli, C. Castiglioni, S. Bianchessi, R. Zippel y D. Parolaro (2006). **Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance: a role for RAS-ERK cascade.** *Mol Neurobiol* 33(3): 199-213.
- Ryberg, E., N. Larsson, S. Sjogren, S. Hjorth, N. O. Hermansson, J. Leonova, T. Elebring, K. Nilsson, T. Drmota y P. J. Greasley (2007). **The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor.** *Br J Pharmacol* 152(7): 1092-101.
- Sagredo, O., M. Garcia-Arencibia, E. de Lago, S. Finetti, A. Decio y J. Fernandez-Ruiz (2007). **Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders.** *Mol Neurobiol* 36(1): 82-91.
- Sakmar, T. P. (1998). **Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 59: 1-34.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa y R. J. Lefkowitz (1993). **A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model.** *J Biol Chem* 268(7): 4625-36.
- Sanchez-Gonzalez, M. A., M. A. Garcia-Cabezas, B. Rico y C. Cavada (2005). **The primate thalamus is a key target for brain dopamine.** *J Neurosci* 25(26): 6076-83.
- Santini, E., E. Valjent y G. Fisone (2008). **Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction.** *FEBS J* 275(7): 1392-9.
- Saura, C., F. Ciruela, V. Casado, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís y R. Franco (1996). **Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes.** *J Neurochem* 66(4): 1675-82.
- Saura, C. A., J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís y R. Franco (1998). **Adenosine deaminase and A1 adenosine receptors internalize together following agonist-induced receptor desensitization.** *J Biol Chem* 273(28): 17610-7.
- Scarselli, M., M. Armogida, S. Chiacchio, M. G. DeMontis, A. Colzi, G. U. Corsini y R. Maggio (2000). **Reconstitution of functional dopamine D(2s) receptor by co-expression of amino- and carboxyl-terminal receptor fragments.** *Eur J Pharmacol* 397(2-3): 291-6.

- Schaferling, M. y S. Nagl (2011). **Forster resonance energy transfer methods for quantification of protein-protein interactions on microarrays.** Methods Mol Biol 723: 303-20.
- Schapira, A. H., E. Bezdard, J. Brotchie, F. Calon, G. L. Collingridge, B. Ferger, B. Hengerer, E. Hirsch, P. Jenner, N. Le Novere, J. A. Obeso, M. A. Schwarzschild, U. Spampinato y G. Davidai (2006). **Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease.** Nat Rev Drug Discov 5(10): 845-54.
- Schiffmann, S. N., G. Fisone, R. Moresco, R. A. Cunha y S. Ferre (2007). **Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology.** Prog Neurobiol 83(5): 277-92.
- Schlicker, E., J. Timm, J. Zentner y M. Gothert (1997). **Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 356(5): 583-9.
- Schlossmacher, M. G., M. P. Frosch, W. P. Gai, M. Medina, N. Sharma, L. Forno, T. Ochiishi, H. Shimura, R. Sharon, N. Hattori, J. W. Langston, Y. Mizuno, B. T. Hyman, D. J. Selkoe y K. S. Kosik (2002). **Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies.** Am J Pathol 160(5): 1655-67.
- Schneider, L. H., R. B. Murphy y E. E. Coons (1982). **Lateralization of striatal dopamine (D2) receptors in normal rats.** Neurosci Lett 33(3): 281-4.
- Schober, A. (2004). **Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP.** Cell Tissue Res 318(1): 215-24.
- Schuh, S. M., B. Hille y D. F. Babcock (2007). **Adenosine and catecholamine agonists speed the flagellar beat of mammalian sperm by a non-receptor-mediated mechanism.** Biol Reprod 77(6): 960-9.
- Schulte, G. y B. B. Fredholm (2003). **Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases.** Cell Signal 15(9): 813-27.
- Schulte, G., A. Schambony y V. Bryja (2010). **beta-Arrestins - scaffolds and signalling elements essential for WNT/Frizzled signalling pathways?** Br J Pharmacol 159(5): 1051-8.
- Schultz, W. (2010). **Multiple functions of dopamine neurons.** F1000 Biol Rep 2.
- Schulz, A., R. Grosse, G. Schultz, T. Gudermann y T. Schoneberg (2000). **Structural implication for receptor oligomerization from functional reconstitution studies of mutant V2 vasopressin receptors.** J Biol Chem 275(4): 2381-9.
- Schwarzschild, M. A., J. F. Chen y A. Ascherio (2002). **Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD.** Neurology 58(8): 1154-60.
- Schwarzschild, M. A., L. Agnati, K. Fuxe, J. F. Chen y M. Morelli (2006). **Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease.** Trends Neurosci 29(11): 647-54.
- Sebastiao, A. M. y J. A. Ribeiro (2009). **Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine.** Curr Neuropharmacol 7(3): 180-94.
- Sedelis, M., K. Hofele, G. W. Auburger, S. Morgan, J. P. Huston y R. K. Schwarting (2000). **MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences.** Behav Genet 30(3): 171-82.
- Segawa, M. (2003). **Neurophysiology of Tourette's syndrome: pathophysiological considerations.** Brain Dev 25 Suppl 1: S62-9.
- Seidel, M. G., M. Klinger, M. Freissmuth y C. Holler (1999). **Activation of mitogen-activated protein kinase by the A(2A)-adenosine receptor via a rap1-**

- dependent and via a p21(ras)-dependent pathway.** *J Biol Chem* 274(36): 25833-41.
- Seifert, R. y K. Wenzel-Seifert (2002). **Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366(5): 381-416.
- Senba, E., P. E. Daddona y J. I. Nagy (1987). **Transient expression of adenosine deaminase in facial and hypoglossal motoneurons of the rat during development.** *J Comp Neurol* 255(2): 217-30.
- Sharir, H. y M. E. Abood (2010). **Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor.** *Pharmacol Ther* 126(3): 301-13.
- Sharkey, J., M. C. Ritz, J. A. Schenden, R. C. Hanson y M. J. Kuhar (1988). **Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain.** *J Pharmacol Exp Ther* 246(3): 1048-52.
- Shen, M., T. M. Piser, V. S. Seybold y S. A. Thayer (1996). **Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures.** *J Neurosci* 16(14): 4322-34.
- Sheng, M. y C. C. Hoogenraad (2007). **The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view.** *Annu Rev Biochem* 76: 823-47.
- Shenolikar, S., C. M. Minkoff, D. A. Steplock, C. Evangelista, M. Liu y E. J. Weinman (2001). **N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization.** *FEBS Lett* 489(2-3): 233-6.
- Shimohama, S., H. Sawada, Y. Kitamura y T. Taniguchi (2003). **Disease model: Parkinson's disease.** *Trends Mol Med* 9(8): 360-5.
- Shire, D., B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, D. Oustric, B. Pesseque, O. Bonnin-Cabanne, G. Le Fur, D. Caput y P. Ferrara (1996). **Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor.** *Biochim Biophys Acta* 1307(2): 132-6.
- Sideraki, V., K. A. Mohamedali, D. K. Wilson, Z. Chang, R. E. Kellems, F. A. Quioko y F. B. Rudolph (1996). **Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase.** *Biochemistry* 35(24): 7862-72.
- Sideraki, V., D. K. Wilson, L. C. Kurz, F. A. Quioko y F. B. Rudolph (1996). **Site-directed mutagenesis of histidine 238 in mouse adenosine deaminase: substitution of histidine 238 does not impede hydroxylate formation.** *Biochemistry* 35(47): 15019-28.
- Sidhpura, N. y L. H. Parsons **Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior.** *Neuropharmacology* 61(7): 1070-87.
- Silva, M. A., B. Topic, V. Lamounier-Zepter, J. P. Huston, C. Tomaz y M. Barros (2007). **Evidence for hemispheric specialization in the marmoset (*Callithrix penicillata*) based on lateralization of behavioral/neurochemical correlations.** *Brain Res Bull* 74(6): 416-28.
- Singer, T. P., R. R. Ramsay, K. McKeown, A. Trevor y N. E. Castagnoli, Jr. (1988). **Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).** *Toxicology* 49(1): 17-23.
- Smith, F. D., G. S. Oxford y S. L. Milgram (1999). **Association of the D2 dopamine receptor third cytoplasmic loop with spinophilin, a protein phosphatase-1-interacting protein.** *J Biol Chem* 274(28): 19894-900.
- Smith, Y. y J. Z. Kieval (2000). **Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia.** *Trends Neurosci* 23(10 Suppl): S28-33.

- Smits, P., P. Boekema, R. De Abreu, T. Thien y A. van 't Laar (1987). **Evidence for an antagonism between caffeine and adenosine in the human cardiovascular system.** *J Cardiovasc Pharmacol* 10(2): 136-43.
- Soderberg, O., M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K. J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L. G. Larsson y U. Landegren (2006). **Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation.** *Nat Methods* 3(12): 995-1000.
- Soderberg, O., K. J. Leuchowius, M. Gullberg, M. Jarvius, I. Weibrecht, L. G. Larsson y U. Landegren (2008). **Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay.** *Methods* 45(3): 227-32.
- Sokoloff, P., J. Diaz, B. Le Foll, O. Guillin, L. Leriche, E. Bezard y C. Gross (2006). **The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(1): 25-43.
- Soriano, A., R. Ventura, A. Molero, R. Hoen, V. Casado, A. Cortes, F. Fanelli, F. Albericio, C. Lluís, R. Franco y M. Royo (2009). **Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers.** *J Med Chem* 52(18): 5590-602.
- Sotnikova, T. D., J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov y M. G. Caron (2006). **Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter.** *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5(1): 45-56.
- Spicuzza, L., G. Di Maria y R. Polosa (2006). **Adenosine in the airways: implications and applications.** *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 77-88.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes y M. Goedert (1997). **Alpha-synuclein in Lewy bodies.** *Nature* 388(6645): 839-40.
- Stehle, J. H., S. A. Rivkees, J. J. Lee, D. R. Weaver, J. D. Deeds y S. M. Reppert (1992). **Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype.** *Mol Endocrinol* 6(3): 384-93.
- Stiles, G. L. (1986). **Photoaffinity cross-linked A1 adenosine receptor-binding subunits. Homologous glycoprotein expression by different tissues.** *J Biol Chem* 261(23): 10839-43.
- Stryer, L. (1978). **Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler.** *Annu Rev Biochem* 47: 819-46.
- Su, T. P. y T. Hayashi (2003). **Understanding the molecular mechanism of sigma-1 receptors: towards a hypothesis that sigma-1 receptors are intracellular amplifiers for signal transduction.** *Curr Med Chem* 10(20): 2073-80.
- Sun, W. C., Y. Cao, L. Jin, L. Z. Wang, F. Meng y X. Z. Zhu (2005). **Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors.** *Acta Pharmacol Sin* 26(2): 160-5.
- Surmeier, D. J., W. J. Song y Z. Yan (1996). **Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons.** *J Neurosci* 16(20): 6579-91.
- Surmeier, D. J., J. Ding, M. Day, Z. Wang y W. Shen (2007). **D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons.** *Trends Neurosci* 30(5): 228-35.
- Sveinbjornsdottir, S., A. A. Hicks, T. Jonsson, H. Petursson, G. Gugmundsson, M. L. Frigge, A. Kong, J. R. Gulcher y K. Stefansson (2000). **Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland.** *N Engl J Med* 343(24): 1765-70.

- Svenningsson, P., C. Le Moine, G. Fisone y B. B. Fredholm (1999). **Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors.** Prog Neurobiol 59(4): 355-96.
- Svizenska, I., P. Dubovy y A. Sulcova (2008). **Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review.** Pharmacol Biochem Behav 90(4): 501-11.
- Szabo, B., L. Dorner, C. Pfreundtner, W. Norenberg y K. Starke (1998). **Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum.** Neuroscience 85(2): 395-403.
- Tanner, C. M., R. Ottman, S. M. Goldman, J. Ellenberg, P. Chan, R. Mayeux y J. W. Langston (1999). **Parkinson disease in twins: an etiologic study.** JAMA 281(4): 341-6.
- Terasaka, T., T. Kinoshita, M. Kuno y I. Nakanishi (2004). **A highly potent non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor: efficient drug discovery by intentional lead hybridization.** J Am Chem Soc 126(1): 34-5.
- Terrillon, S. y M. Bouvier (2004). **Roles of G-protein-coupled receptor dimerization.** EMBO Rep 5(1): 30-4.
- Thymiakou, E., V. I. Zannis y D. Kardassis (2007). **Physical and functional interactions between liver X receptor/retinoid X receptor and Sp1 modulate the transcriptional induction of the human ATP binding cassette transporter A1 gene by oxysterols and retinoids.** Biochemistry 46(41): 11473-83.
- Todd, R. D., J. Carl, S. Harmon, K. L. O'Malley y J. S. Perlmutter (1996). **Dynamic changes in striatal dopamine D2 and D3 receptor protein and mRNA in response to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) denervation in baboons.** J Neurosci 16(23): 7776-82.
- Torvinen, M., S. Gines, J. Hillion, S. Latini, M. Canals, F. Ciruela, F. Bordoni, W. Staines, F. Pedata, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre y K. Fuxe (2002). **Interactions among adenosine deaminase, adenosine A(1) receptors and dopamine D(1) receptors in stably cotransfected fibroblast cells and neurons.** Neuroscience 113(3): 709-19.
- Torvinen, M., D. Marcellino, M. Canals, L. F. Agnati, C. Lluís, R. Franco y K. Fuxe (2005). **Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes.** Mol Pharmacol 67(2): 400-7.
- Trejo, J., S. R. Hammes y S. R. Coughlin (1998). **Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting.** Proc Natl Acad Sci U S A 95(23): 13698-702.
- Trussell, L. O. y M. B. Jackson (1985). **Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons.** Proc Natl Acad Sci U S A 82(14): 4857-61.
- Tsao, P. y M. von Zastrow (2000). **Downregulation of G protein-coupled receptors.** Curr Opin Neurobiol 10(3): 365-9.
- Tsukada, H., J. Kreuter, C. E. Maggos, E. M. Unterwald, T. Kakiuchi, S. Nishiyama, M. Futatsubashi y M. J. Kreek (1996). **Effects of binge pattern cocaine administration on dopamine D1 and D2 receptors in the rat brain: an in vivo study using positron emission tomography.** J Neurosci 16(23): 7670-7.
- Tu, J. C., B. Xiao, S. Naisbitt, J. P. Yuan, R. S. Petralia, P. Brakeman, A. Doan, V. K. Aakalu, A. A. Lanahan, M. Sheng y P. F. Worley (1999). **Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins.** Neuron 23(3): 583-92.

- Turu, G. y L. Hunyady **Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor.** J Mol Endocrinol 44(2): 75-85.
- Ujike, H., S. Kuroda y S. Otsuki (1996). **sigma Receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine.** Eur J Pharmacol 296(2): 123-8.
- Ulrich, C. D., 2nd, M. Holtmann y L. J. Miller (1998). **Secretin and vasoactive intestinal peptide receptors: members of a unique family of G protein-coupled receptors.** Gastroenterology 114(2): 382-97.
- Usiello, A., J. H. Baik, F. Rouge-Pont, R. Picetti, A. Dierich, M. LeMeur, P. V. Piazza y E. Borrelli (2000). **Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors.** Nature 408(6809): 199-203.
- Valente, E. M., F. Brancati, V. Caputo, E. A. Graham, M. B. Davis, A. Ferraris, M. M. Breteler, T. Gasser, V. Bonifati, A. R. Bentivoglio, G. De Michele, A. Durr, P. Cortelli, A. Filla, G. Meco, B. A. Oostra, A. Brice, A. Albanese, B. Dallapiccola y N. W. Wood (2002). **PARK6 is a common cause of familial parkinsonism.** Neurol Sci 23 Suppl 2: S117-8.
- Valentine, W. N., D. E. Paglia, A. P. Tartaglia y F. Gilsanz (1977). **Hereditary hemolytic anemia with increased red cell adenosine deaminase (45- to 70-fold) and decreased adenosine triphosphate.** Science 195(4280): 783-5.
- Valenzuela, A., J. Blanco, C. Callebaut, E. Jacotot, C. Lluís, A. G. Hovanessian y R. Franco (1997). **Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles.** J Immunol 158(8): 3721-9.
- Valjent, E., V. Pascoli, P. Svenningsson, S. Paul, H. Enslen, J. C. Corvol, A. Stipanovich, J. Caboche, P. J. Lombroso, A. C. Nairn, P. Greengard, D. Herve y J. A. Girault (2005). **Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum.** Proc Natl Acad Sci U S A 102(2): 491-6.
- Vallone, D., R. Picetti y E. Borrelli (2000). **Structure and function of dopamine receptors.** Neurosci Biobehav Rev 24(1): 125-32.
- Valverde, O. (2005). **Participation of the cannabinoid system in the regulation of emotional-like behaviour.** Curr Pharm Des 11(26): 3421-9.
- van Corven, E. J., P. L. Hordijk, R. H. Medema, J. L. Bos y W. H. Moolenaar (1993). **Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts.** Proc Natl Acad Sci U S A 90(4): 1257-61.
- Van der Weyden, M. B. y W. N. Kelley (1976). **Adenosine deaminase and immune function.** Br J Haematol 34(2): 159-65.
- van Kampen, J. M. y A. J. Stoessl (2003). **Effects of oligonucleotide antisense to dopamine D3 receptor mRNA in a rodent model of behavioural sensitization to levodopa.** Neuroscience 116(1): 307-14.
- Vassart, G. (2010). **An in vivo demonstration of functional G protein-coupled receptor dimers.** Proc Natl Acad Sci U S A 107(5): 1819-20.
- Vidi, P. A. y V. J. Watts (2009). **Fluorescent and bioluminescent protein-fragment complementation assays in the study of G protein-coupled receptor oligomerization and signaling.** Mol Pharmacol 75(4): 733-9.
- Violin, J. D. y R. J. Lefkowitz (2007). **Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors.** Trends Pharmacol Sci 28(8): 416-22.
- Visanji, N. P., S. H. Fox, T. Johnston, G. Reyes, M. J. Millan y J. M. Brotchie (2009). **Dopamine D3 receptor stimulation underlies the development of L-DOPA-induced dyskinesia in animal models of Parkinson's disease.** Neurobiol Dis 35(2): 184-92.

- Volkow, N. D., J. S. Fowler, G. J. Wang, R. Hitzemann, J. Logan, D. J. Schlyer, S. L. Dewey y A. P. Wolf (1993). **Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers.** Synapse 14(2): 169-77.
- Volkow, N. D., Y. S. Ding, J. S. Fowler, G. J. Wang, J. Logan, J. S. Gatley, S. Dewey, C. Ashby, J. Liebermann, R. Hitzemann y et al. (1995). **Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain.** Arch Gen Psychiatry 52(6): 456-63.
- Volkow, N. D., G. J. Wang, J. S. Fowler, M. Fischman, R. Foltin, N. N. Abumrad, S. J. Gatley, J. Logan, C. Wong, A. Gifford, Y. S. Ding, R. Hitzemann y N. Pappas (1999). **Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain.** Life Sci 65(1): PL7-12.
- Volkow, N. D. y J. M. Swanson (2003). **Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD.** Am J Psychiatry 160(11): 1909-18.
- Vuoriluoto, M., L. J. Laine, P. Saviranta, J. Pouwels y M. J. Kallio (2011). **Spatio-temporal composition of the mitotic Chromosomal Passenger Complex detected using in situ proximity ligation assay.** Mol Oncol 5(1): 105-11.
- Waldhoer, M., J. Fong, R. M. Jones, M. M. Lunzer, S. K. Sharma, E. Kostenis, P. S. Portoghese y J. L. Whistler (2005). **A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers.** Proc Natl Acad Sci U S A 102(25): 9050-5.
- Wang, Z. y F. A. Quioco (1998). **Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity.** Biochemistry 37(23): 8314-24.
- Wang, Y., R. Xu, T. Sasaoka, S. Tonegawa, M. P. Kung y E. B. Sankoorikal (2000). **Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions.** J Neurosci 20(22): 8305-14.
- Wardas, J. (2008). **Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia.** Front Biosci 13: 4071-96.
- Weibrecht, I., K. J. Leuchowius, C. M. Clausson, T. Conze, M. Jarvius, W. M. Howell, M. Kamali-Moghaddam y O. Soderberg (2010). **Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox.** Expert Rev Proteomics 7(3): 401-9.
- Weihofen, W. A., J. Liu, W. Reutter, W. Saenger y H. Fan (2004). **Crystal structure of CD26/dipeptidyl-peptidase IV in complex with adenosine deaminase reveals a highly amphiphilic interface.** J Biol Chem 279(41): 43330-5.
- Weiss, J. M., P. H. Morgan, M. W. Lutz y T. P. Kenakin (1996). **The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy.** J Theor Biol 181(4): 381-97.
- Welter, M., D. Vallone, T. A. Samad, H. Meziane, A. Usiello y E. Borrelli (2007). **Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine.** Proc Natl Acad Sci U S A 104(16): 6840-5.
- Wesley, U. V., A. P. Albino, S. Tiwari y A. N. Houghton (1999). **A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells.** J Exp Med 190(3): 311-22.
- Westlake, T. M., A. C. Howlett, T. I. Bonner, L. A. Matsuda y M. Herkenham (1994). **Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization**

- histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains.** Neuroscience 63(3): 637-52.
- White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord y F. H. Marshall (1998). **Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor.** Nature 396(6712): 679-82.
- Wilson, D. K., F. B. Rudolph y F. A. Quijano (1991). **Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations.** Science 252(5010): 1278-84.
- Wilson, D. K. y F. A. Quijano (1993). **A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water.** Biochemistry 32(7): 1689-94.
- Wise, R. A. (1996). **Neurobiology of addiction.** Curr Opin Neurobiol 6(2): 243-51.
- Woods, A. S. y M. A. Huestis (2001). **A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization.** J Am Soc Mass Spectrom 12(1): 88-96.
- Wreggett, K. A. y A. De Lean (1984). **The ternary complex model. Its properties and application to ligand interactions with the D2-dopamine receptor of the anterior pituitary gland.** Mol Pharmacol 26(2): 214-27.
- Wreggett, K. A. y J. W. Wells (1995). **Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors.** J Biol Chem 270(38): 22488-99.
- Wu, D. F., L. Q. Yang, A. Goschke, R. Stumm, L. O. Brandenburg, Y. J. Liang, V. Holtt y T. Koch (2008). **Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors.** J Neurochem 104(4): 1132-43.
- Wu, X. H., G. L. Zou, J. M. Quan y Y. D. Wu (2010). **A theoretical study on the catalytic mechanism of Mus musculus adenosine deaminase.** J Comput Chem 31(12): 2238-47.
- Xu, M., X. T. Hu, D. C. Cooper, R. Moratalla, A. M. Graybiel, F. J. White y S. Tonegawa (1994). **Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice.** Cell 79(6): 945-55.
- Yamamoto, B. K., R. F. Lane y C. R. Freed (1982). **Normal rats trained to circle show asymmetric caudate dopamine release.** Life Sci 30(25): 2155-62.
- Yeung, C. Y., D. E. Ingolia, D. B. Roth, C. Shoemaker, M. R. Al-Ubaidi, J. Y. Yen, C. Ching, C. Bobonis, R. J. Kaufman y R. E. Kellems (1985). **Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in Escherichia coli.** J Biol Chem 260(18): 10299-307.
- Yu, P. B., C. C. Hong, C. Sachidanandan, J. L. Babitt, D. Y. Deng, S. A. Hoyng, H. Y. Lin, K. D. Bloch y R. T. Peterson (2008). **Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism.** Nat Chem Biol 4(1): 33-41.
- Yuan, H., S. Sarre, G. Ebinger y Y. Michotte (2005). **Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease.** J Neurosci Methods 144(1): 35-45.
- Yuforov, V., Y. Zhou, R. Spangler, C. E. Maggos, A. Ho y M. J. Kreek (1999). **Acute "binge" cocaine increases mu-opioid receptor mRNA levels in areas of the rat mesolimbic mesocortical dopamine system.** Brain Res Bull 48(1): 109-12.

- Zack, M. y C. X. Poulos (2009). **Parallel roles for dopamine in pathological gambling and psychostimulant addiction.** *Curr Drug Abuse Rev* 2(1): 11-25.
- Zhang, D., L. Zhang, Y. Tang, Q. Zhang, D. Lou, F. R. Sharp, J. Zhang y M. Xu (2005). **Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors.** *Neuropsychopharmacology* 30(8): 1443-54.
- Zhou, Q. Y., C. Li, M. E. Olah, R. A. Johnson, G. L. Stiles y O. Civelli (1992). **Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7432-6.
- Zhu, X. y J. Wess (1998). **Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function.** *Biochemistry* 37(45): 15773-84.
- Zimmermann, T., J. Rietdorf, A. Girod, V. Georget y R. Pepperkok (2002). **Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair.** *FEBS Lett* 531(2): 245-9.
- Zink, C. F., G. Pagnoni, M. E. Martin, M. Dhamala y G. S. Berns (2003). **Human striatal response to salient nonrewarding stimuli.** *J Neurosci* 23(22): 8092-7.

