

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche



## CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

Eterodimeri A2A-D2 in astrociti striatali: evidenze fisiche

Candidata: **Katia Santamarena**

Relatore: **Prof. Ernesto Fedele**

Correlatore: **Prof.ssa Chiara Cervetto**

Anno Accademico 2019/2020

# Sommario

<b>1.INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
1.1 DIMERIZZAZIONE DI GPCRs: PROVE SPERIMENTALI E TECNICHE.....	6
1.2 CRITERI PER DIMOSTRARE ETRODIMERIZZAZIONE TRA GPCRs.....	7
1.2.1 CRITERIO 1: LA CO-LOCALIZZAZIONE E L'INTERAZIONE FISICA TRA PROTOMERI, DIRETTA O MEDIATA DA PROTEINE CHE AGISCONO DA MODULATORI ALLOSTERICI, È UNA CONDIZIONE NECESSARIA PER GLI ETEROMERI.....	8
1.2.2 CRITERIO 2: ETROMERI E SINGOLI PROTOMERI DOVREBBERO AVERE PROPRIETÀ DISTINTE.....	9
1.2.3 CRITERIO 3: MOLECOLE FARMACOLOGICAMENTE SELETTIVE PER GLI ETEROMERI DOVREBBERO ALTERARNE LE PROPRIETÀ SPECIFICHE .....	10
1.3 TECNICHE PER LO STUDIO DI OMO/ETEROMERI.....	11
1.3.1 IBRIDAZIONE IN SITU, IMMUNOISTOCHEMICA E MICROSCOPIA ELETTRONICA .....	11
1.3.2 TECNICHE BIOFISICHE <i>PROXIMITY-BASED</i> .....	11
1.3.3 PLA: PROXIMITY LIGATION ASSAY.....	12
1.3.4 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE E WESTERN BLOT .....	14
1.3.5 UTILIZZO DI RADIOLIGANDI PER LA VALUTAZIONE DI ALTERAZIONI NEL BINDING PER LIGANDI SPECIFICI.....	14
1.3.6 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ DI SIGNALING PER PROTOMERI ED ETEROMERI.....	15
1.3.7 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ DI TRAFFICKING PER PROTOMERI ED ETEROMERI.....	16
1.3.8 STUDIO FUNZIONALE DELLE PROPRIETÀ DEGLI ETROMERI CON ANTICORPI ETEROMERO-SELETTIVI E LIGANDI BIVALENTI.....	17
1.3.9 STUDIO FUNZIONALE DELLE PROPRIETÀ DEGLI ETROMERI CON ANIMALI TRANSGENICI .....	18
1.4 ADENOSINA ED ETRODIMERI A2A-D2 IN TESSUTI NATIVI.....	19

1.4.1 ETEROMERO A2A-D2 E LE PROVE PER LA SODDISFAZIONE DEI TRE CRITERI. .....	20
1.4.2 ETERODIMERI A2A-D2 NELLO STRIATO: IL CONCETTO DI INTERAZIONE INTRAMEMBRANA TRA RECETTORI.....	20
1.4.3 A2A-D2: LA MODULAZIONE DI D2 SUI RECETTORI A2A .....	21
1.4.4 A2A-D2: DISSOCIAZIONE FUNZIONALE TRA L'ECCITABILITA' NEURONALE E L'ESPRESSIONE GENICA .....	23
1.4.5 A2A-D2 NEGLI ASTROCITI STRIATALI: PROVE DI ETEROMERIZZAZIONE.....	24
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>27</b>
3.1 ANIMALI .....	27
3.2 PREPARAZIONE DI PROCESSI ASTROCITARI PURIFICATI .....	27
3.3 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA E MICROSCOPIA CONFOCALE SU GLIOSOMI .....	28
3.4 ANALISI ULTRASTRUTTURALE E MICROSCOPIA ELETTRONICA SU GLIOSOMI .....	29
3.5 ANALISI WESTERN BLOT E CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE DEI RECETTORI A2A E D2 IN MEMBRANE GLIOSOMIALI .....	30
3.6 PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA) IN FETTINE STRIATALI DI RATTO ADULTO.....	30
3.7 MATERIALI .....	31
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>32</b>
4.1 GLI ASTROCITI DI STRIATO ESPRIMONO I RECETTORI A2A E D2 .....	34
4.2 UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI PROCESSI ASTROCITARI STRIATALI ESPRIME RECETTORI A2A E D2 .....	35
4.3 I PROCESSI ASTROCITARI POSSIEDONO TRASPORTATORI VESICOLARI DEL GLUTAMMATO .....	37
4.4 I RECETTORI A2A E D2 SONO ESPRESSI SU PROCESSI ASTROCITARI CHE DISPONGONO DI VGLUT1 .....	39
4.5 I RECETTORI A2A E D2 INTERAGISCONO FISICAMENTE: CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	41
4.6 I RECETTORI A2A E D2 INTERAGISCONO FISICAMENTE: PLA .....	43
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>46</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

# 1.INTRODUZIONE

Una delle più numerose famiglie di proteine target per lo sviluppo di nuovi farmaci sono i recettori accoppiati a proteina G (*G-protein coupled receptors* o GPCRs). Queste unità funzionali sono strutturalmente caratterizzate da catene amminoacidiche con la porzione N-terminale extracellulare, 7 domini transmembrana (TM) ad  $\alpha$ -elica separati da loop alternati intra ed extracellulari e dal dominio C-terminale intracellulare.

I GPCRs sono responsabili del controllo di numerosi processi fisiologici e della percezione dell'ambiente esterno e rappresentano una delle vie più comuni di trasduzione del segnale; sono attivabili da una molteplicità di molecole endogene come ammine, peptidi, ormoni, amminoacidi e lipidi, ricoprendo un ruolo chiave nella comunicazione tra cellule.

I GPCRs erano descritti come entità monomeriche capaci di interagire con proteine G in seguito all'interazione con il ligando e con la successiva attivazione della cascata degli effettori intracellulari.

In seguito, si pensò di cambiarne il nome a *recettori a 7 domini transmembrana (7TM)* in quanto studi sperimentali dimostrarono che alcune funzioni dei GPCRs non potevano essere spiegate con l'attivazione di proteine G e quindi il nome poteva sembrare riduttivo a questa via di trasduzione del segnale. Infatti le evidenze sperimentali sembravano indicare sempre più chiaramente che molti GPCRs modulano l'attività di vari sistemi di *signaling* e che possono essere attivati da differenti ligandi. Inoltre sembra sempre più chiaro che diversi ligandi siano capaci di attivare singoli GPCR ma con diverse potenze ed efficacia relativa, con attivazione di *pathways* diversi, riflettendo quello che è stato teorizzato nei diversi stati di attivazione dei recettori stessi. In pratica i singoli ligando potrebbero stabilizzare alcuni di questi stadi in modo selettivo (Galandrin et al. 2007).

Dagli anni '80, si iniziò a parlare di assemblamenti multimerici di recettori in quanto evidenze sperimentali indicavano che i GPCRs fossero capaci di interagire allostericamente tra loro a livello della membrana cellulare (Agnati et al. 1980; 1982; Fuxe et al.1983a; 1998; Bockaert and Pin 1999; Xie et al. 1999; Franco et al. 2000; Overton and Blumer, 2000; Zeng and Wess 2000; Angers et al. 2001; Dean et al. 2001; Devi 2001; Portoghese 2001; Christopoulos and Kenakin 2002; Kenakin 2002). Le prime prove dell'interazione tra GPCRs a livello della membrana cellulare sono state ottenute su modelli *in vitro* come membrane cellulari o sezioni cerebrali (Agnati et al.1980; 1983a; Fuxe et al.1981; 1983a) e successivamente *in vivo* con studi

funzionali (Agnati et al. 1983b; 1985; Fuxe et al. 1983b; 1984; 1986).

I GPCRs diventavano così sistemi estremamente complessi capaci di modulazione vicendevole, creando un nuovo meccanismo integrato per la decodifica di segnali chimici. Contemporaneamente cambiava la complessità e il significato di un segnale chimico che aveva una molteplicità di sistemi di riconoscimento e decodifica presenti su ogni singola cellula.

La recente revisione del modello classico di trasduzione del segnale per i GPCRs (Chilmonczyk et al. 2014) ha portato ad un nuovo paradigma per cui oggi i recettori 7TM attivano *pathways* di segnali indipendenti dalla proteina eterotrimerica G tradizionalmente correlata; inoltre, in presenza di uno stimolo persistente, ligandi citosolici sarebbero in grado di spegnere la risposta o disaccoppiare il recettore dalla proteina G e mediarne l'internalizzazione (Lefkowitz and Shenoy 2005).

È evidente che si sono aperti importanti ambiti di studio per dimostrare l'esistenza di complessi recettoriali multimerici (omo o eteromerici) in modelli cellulari, in sistemi nativi (Borrito-Escuela et al. 2013b; Bouvier and Hébert 2014; Guidolin et al. 2015) e, nel Sistema Nervo Centrale (SNC), capaci di modulare il rilascio di neuro e gliotrasmettitori. Nonostante il forte impatto che la loro esistenza ed attivazione possa determinare nella possibilità di attivare divergenti risposte cellulari si riscontrano però ancora pochi studi a riguardo.

Il quadro si complica ulteriormente perché un modulatore allosterico potrebbe determinare non solo un'alterazione conformazionale del suo recettore target ma anche l'attivazione di un secondo sistema di trasduzione del segnale (Agnati et al. 2006a, b; Kenakin and Miller 2010).

Di conseguenza, ogni singolo segnale chimico potrebbe avere una valenza multipla; lo studio della funzione di complessi multimerici è quindi importante per ampliare le nostre conoscenze sul controllo della trasmissione nel SNC in condizioni fisiologiche e patologiche, al fine di individuare nuove strategie terapeutiche per patologie del SNC e disordini neuropsichiatrici.

È quindi importante per comprendere i meccanismi della trasmissione nel SNC in condizioni fisiologiche e patologiche, al fine di individuare nuove strategie terapeutiche per patologie del SNC e disordini neuropsichiatrici.

La capacità del ligando di modulare la dimerizzazione recettoriale è stata dimostrata in alcuni studi ma non in altri, lasciando comunque valide entrambe le ipotesi. Per quanto riguarda l'interazione fisica e funzionale dei recettori A2A-D2, oggetto di questa tesi di laurea, le prime evidenze sono state determinate su membrane cellulari (Agnati et al. 2010a; Trifilieff et al. 2011; Borrito-Escuela et al. 2013a, b; Guidolin et al. 2015) e poi su modelli *ex vivo* con prove funzionali di tale interazione in processi astrocitari di striato (Cervetto et al. 2016 e 2018).

Nei successivi capitoli mi soffermerò sulle evidenze scientifiche che è necessario fornire per

poter dimostrare l'interazione tra due recettori e poter effettivamente parlare di eteromeri recettoriali; nei risultati illustrerò i dati ottenuti durante lo svolgimento della mia tesi sperimentale relativamente all'eteromero A2A-D2 in astrociti striatali di ratto adulto.

## 1.1 DIMERIZZAZIONE DI GPCRs: PROVE SPERIMENTALI E TECNICHE

Per dimostrare l'interazione tra due recettori a livello della membrana cellulare è necessario avvalersi di un approccio multiplo capace di verificare co-localizzazione dei GPCRs nello stesso microdominio, vicinanza fisica (pochi nanometri), modulazione allosterica, co-internalizzazione, rottura dell'eterodimero o blocco della sua formazione (Agnati et al. 2010a; Fuxe et al. 2012; Guidolin et al. 2015).

La presenza di dimeri recettoriali era ritenuta un'eccezione, ma poi gradualmente questo concetto venne accettato come una caratteristica generale per i GPCRs: studi basati sull'utilizzo della tecnica *Resonance Energy Transfer* (RET) dimostrarono infatti la presenza di etero- ed omorecettori nativi (Angers et al. 2002; Eidne et al. 2002; George et al. 2002).

La dimostrazione storica che ha indicato l'esistenza di recettori dimerici è stata quella relativamente ai recettori metabotropi GABA<sub>B</sub> che sappiamo esistere come eterodimeri obbligati (Marshall et al. 1999).

È ormai chiaro che i GPCRs possono formare omo o eteromeri (Milligan et al. 2005; Pin et al. 2007; Ferrè et al. 2009; Lhose et al. 2010; Gomes et al. 2013a) e sono stati da Ferrè come "complessi macromolecolari composti, per essere funzionali, da almeno due unità recettoriali (dette anche protomeri) e con proprietà biochimiche che si dimostrano diverse da quelle dei componenti individuali" (Ferrè et al. 2009).

Kniazeff e colleghi, studiando i recettori metabotropici del glutammato (mGlu), dimostrarono che i dimeri GPCRs rappresentassero l'unità operativa e che l'attivazione di entrambi i protomeri fosse necessaria per ottenere un accoppiamento ottimale con la proteina G (Kniazeff et al. 2004). La dimerizzazione ricopre un ruolo importante anche in altri aspetti che riguardano i GPCRs, come ad esempio la loro biosintesi ed il trasporto in membrana. Per quanto riguarda la dimerizzazione questa può avvenire in maniera precoce durante il processo biosintetico, nel reticolo endoplasmatico (ER), (Ayoub et al. 2002; Issafras et al. 2002; Terrillon et al. 2003; Salahpour et al. 2004). Nel caso invece degli mGlu sembra che i dimeri, unità operativa, non

siano costitutivamente prodotti, ma che la loro formazione sia promossa dal ligando (AbdAlla et al. 1999; Rodriguez-Frade et al. 1999; Rocheville et al. 2000; Villa-Coro et al. 2000; Horvat et al. 2001), entrando in contrasto con l'ipotesi primaria secondo la quale che la dimerizzazione recettoriale sia necessaria per la localizzazione in membrana.

La capacità del ligando di modulare la dimerizzazione recettoriale è stata dimostrata in alcuni studi ma non in altri, lasciando comunque valide entrambe le ipotesi. Diverse condizioni come la presenza di due recettori sintetizzati contemporaneamente e nello stesso posto per assemblarsi in un eterodimero, fenomeni come la co-espressione nella stessa cellula e la regolazione temporale della sintesi di ciascun recettore, contribuiscono al processo di selettività necessario affinché il processo di eterodimerizzazione avvenga.

Vari studi suggeriscono che nel processo di dimerizzazione vengono coinvolti diversi domini: per alcuni recettori caratterizzati da ampie porzioni extracellulari, la formazione di ponti disolfuro tra residui di cisteina N-terminali contribuisce alla dimerizzazione (Ray et al. 1999; Kunishima et al. 2000). Poiché questi legami possono essere eliminati senza causare una completa perdita dei dimeri, sembra chiaro che altri domini debbano essere coinvolti nel processo di dimerizzazione (Zhang et al. 2001). A sostegno di questa tesi compaiono le evidenze per i recettori GABA<sub>B1</sub> e GABA<sub>B2</sub>, dove certamente anche il dominio C-terminale possiede la capacità di stabilizzare i dimeri recettoriali.

Numerosi autori indicano che i domini transmembrana (TM) ad  $\alpha$  elica siano maggiormente responsabili sia di omo- che di eterodimerizzazione recettoriale (Hebert et al. 1996; Overton et al. 2003; Hernanz-Falcon et al. 2004; Salahpour et al. 2004).

## **1.2 CRITERI PER DIMOSTRARE ETERODIMERIZZAZIONE TRA GPCRs**

Nel corso degli anni sono stati svolti numerosi studi con tecniche diverse che hanno condotto a risultati interessanti, ma talvolta contrastanti (Hansen et al. 2009; Frederick et al. 2015).

Per una valutazione critica ed approfondita degli eteromeri endogeni, è stato proposto un insieme di regole (Ferrè et al. 2009) e successivamente Gomes e collaboratori (Gomes et al. 2016) hanno elencato i requisiti standard e individuato tre criteri da rispettare per dimostrare la presenza di eteromeri di GPCRs in tessuti nativi.

### **1.2.1 CRITERIO 1: LA CO-LOCALIZZAZIONE E L'INTERAZIONE FISICA TRA PROTOMERI, DIRETTA O MEDIATA DA PROTEINE CHE AGISCONO DA MODULATORI ALLOSTERICI, È UNA CONDIZIONE NECESSARIA PER GLI ETROMERI**

La valutazione di questi aspetti è stata spesso perseguita e soddisfatta per lo studio di molti eteromeri. Questo criterio può essere soddisfatto dimostrando quanto segue in tessuto nativo di animali *wild-type* (e non nei tessuti di animali in cui uno dei recettori sia mancante):

- (a) co-localizzazione dei protomeri del recettore all'interno di un compartimento cellulare;
- (b) co-immunoprecipitazione dei protomeri;
- (c) stretta vicinanza tra i protomeri del recettore; solo una distanza massima tra i protomeri infatti consentirebbe le rispettive interazioni allosteriche.

Questo criterio risulta essere quello più frequentemente applicato e per rispettarlo dovrebbero essere utilizzati una combinazione di studi di co-localizzazione, metodi *proximity-based*, e test di co-immunoprecipitazione su cellule e tessuti nativi. Infatti, il solo utilizzo di studi di co-localizzazione generalmente non fornisce una sufficiente risoluzione subcellulare per stabilire la stretta vicinanza tra protomeri; la co-immunoprecipitazione può verificarsi anche se i recettori tra loro relativamente distanti per potersi modulare allostericamente l'un l'altro. I test *proximity-based* sono stati recentemente utilizzati proprio per dimostrare la vicinanza tra protomeri. Questi ultimi metodi rappresentano tecniche relativamente nuove nell'ambito degli studi effettuati su tessuti nativi e quindi fino ad oggi la dimostrazione di co-localizzazione e co-immunoprecipitazione è stata sufficiente per ritenere il primo criterio soddisfatto.

## 1.2.2 CRITERIO 2: ETEROMERI E SINGOLI PROTOMERI DOVREBBERO AVERE PROPRIETÀ DISTINTE

La ricerca farmacologica moderna ha capito la potenzialità degli studi su protomeri ed eteromeri a causa della loro potenziale utilità per lo sviluppo di nuove terapie.

Per un eteromero è fondamentale conoscerne proprietà farmacologiche, di *signaling* e di *trafficking* (Ferrè et al. 2009). Per semplificare gli studi su questi aspetti si è frequentemente ricorso a studi su cellule eterologhe progettate per esprimere singoli recettori protomeri e ricombinanti. Questo approccio tecnologico consente il controllo del livello dell'espressione dei protomeri ma anche l'utilizzo, come controlli, di cellule che esprimono singoli protomeri, contribuendo così ad ottenere informazioni preziose su aspetti farmacologici e sul *signaling* dell'eteromero e dei protomeri. Inoltre, in questo modo è anche possibile valutare se l'espressione dei due recettori sia sufficiente a rivelare l'impronta digitale biochimica dell'eteromero in un tessuto nativo, sostenendo così l'idea che i due recettori siano necessari e sufficienti a produrre la nuova farmacologia dell'eteromero nel tessuto nativo.

Questo criterio può essere soddisfatto studiando quindi proprietà farmacologiche, di *signaling* e di *trafficking* sia nelle cellule che esprimono i protomeri sia in cellule con recettori ricombinanti. Questo tipo di analisi dovrà però essere condotta anche su tessuti degli animali *wilde-type* con il fine di individuare gli stessi parametri e se questi si avvicinano o si discostano a quanto osservato in cellule transfettate. Allo stesso tempo, queste caratteristiche farmacologiche, di *signaling* e di *trafficking*, non si dovranno osservare nei tessuti degli animali che mancano di uno dei protomeri del recettore, con attenuazione o perdita delle stesse in caso di disfunzione dell'eteromero.

### **1.2.3 CRITERIO 3: MOLECOLE FARMACOLOGICAMENTE SELETTIVE PER GLI ETROMERI DOVREBBERO ALTERARNE LE PROPRIETÀ SPECIFICHE**

L'obiettivo di questo criterio è quello di valutare gli aspetti funzionali degli eteromeri correlandoli ad un ruolo fisiologico o patologico e ciò può essere perseguito utilizzando molecole o strumenti in grado di distruggere gli eteromeri nativi, attenuando la segnalazione eteromero-selettiva e comportando l'alterazione della funzione *in vivo* o in modelli *in vitro*.

Alcuni degli approcci possibili sono l'utilizzo di peptidi capaci di permeare la membrana cellulare e che riescano ad agire a livello dell'interfaccia eteromerică o di animali transgenici che esprimono protomeri mutanti incapaci di formare eteromeri.

In particolare, è importante soffermarsi sugli strumenti che riconoscono o attivano gli eteromeri nel tessuto nativo, ad esempio gli anticorpi selettivi che permettono di individuare eteromeri sia in condizioni fisiologiche che patologiche e ligandi che legano in modo selettivo gli eteromeri. Di particolare interesse sono le molecole bifunzionali (o multifunzionali) capaci di legare in modo selettivo i siti di legame ortosterici di ipotetici eteromeri.

Di seguito riporto alcune delle tecniche impiegate nello studio dei recettori omo o eteromerici per soddisfare i tre criteri appena illustrati.

## 1.3 TECNICHE PER LO STUDIO DI OMO/ETEROMERI

### 1.3.1 IBRIDAZIONE IN SITU, IMMUNOISTOCHEMICA E MICROSCOPIA ELETTRONICA

Due protomeri possano formare un eteromero *in vivo* se sono espressi nella stessa cellula. Partendo da questo requisito, per determinare la co-localizzazione di GPCRs nella stessa cellula, la tecnica dell'ibridazione *in situ* e l'uso di due sonde fluorescenti diverse (Levsky et al. 2003) ha semplificato notevolmente i processi. Questa tecnica però, si limita ad evidenziare la presenza di mRNA e non la co-localizzazione di proteine recettoriali nello stesso compartimento cellulare per le quali è necessario la microscopia elettronica combinata con analisi immunoistochimica (Chabot et al. 1996). Questa tecnica è stata utilizzata anche in questa tesi (vedi Materiali e Metodi ed il capitolo Risultati).

Con l'applicazione di microscopia elettronica associata ad una analisi immunoistochimica è infatti possibile localizzare due protomeri nello stesso comparto cellulare e subcellulare usando due anticorpi specifici per i singoli protomeri (Kackzor et al. 2011). Solo la combinazione di un'analisi immunoistochimica con la microscopia a super-risoluzione potrà rilevare la presenza di singoli protomeri nella stessa cellula e persino nello stesso comparto cellulare (Weibrecht et al. 2010; Jonas et al. 2015).

### 1.3.2 TECNICHE BIOFISICHE PROXIMITY-BASED

Per stabilire la prossimità dei protomeri oggi le tecniche biofisiche *proximity-based* sono gli approcci privilegiati.

La tecnica più utilizzata e potente è la RET, grazie soprattutto alla sua capacità di monitoraggio in tempo reale e in cellule vive dei complessi GPCR (Jager et al. 2014). È però da considerare che una mancanza di RET non stabilisce inequivocabilmente l'assenza di prossimità proteina-proteina, né una perdita di RET necessariamente indica la dissociazione delle proteine da un complesso: un cambiamento conformazionale delle proteine marcate che formano il complesso

può infatti ridurre o eliminare un segnale RET anche se non c'è rottura del complesso stesso in cui sono coinvolti i (Hebert et al. 2006; Ayoub et al. 2015). Inoltre, questa tecnica prevede un legame tra protomeri e proteine fluorescenti che potrebbero interferire con la capacità del protomero di interagire con altre proteine o di funzionare correttamente (Hebert et al. 2006; Kocan et al. 2011). Infine, se ci troviamo in modelli che sovraesprimono proteine esogene (modelli transfettati), si può assistere a fenomeno del bystander RET, anche se le proteine contrassegnate non hanno affinità l'una all'altra (Mercier et al. 2002; Pflieger et al. 2006).

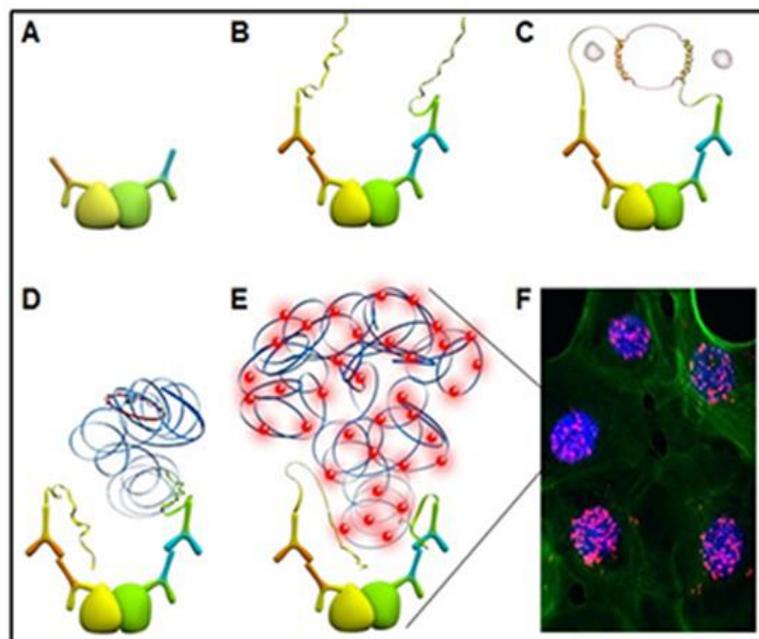
### 1.3.3 PLA: PROXIMITY LIGATION ASSAY

I *proximity ligation assays* (PLAs) sono diventati i test di prima scelta per dimostrare la vicinanza di una varietà di proteine: sono stati utilizzati per verificare l'eterodimerizzazione di recettori cannabinoidi CB1 e CB2 a livello del nucleo accumbens e nel corpo spinale (Callén et al. 2012) e dei recettori A2A dell'adenosina e D2 della dopamina (Trifilieff et al. 2011; Pelassa et al. 2018) oggetti di studio di questa tesi.

La PLA è considerata una tecnica particolarmente importante per dimostrare l'eteromerizzazione dei recettori, perché consente l'identificazione di molecole di recettori nativi distanti fino a 17 nm, considerata la massima distanza possibile tra protomeri per la formazione di eteromeri (Gomes et al. 2016; Trifilieff et al. 2011). La tecnica prevede di usare prima gli anticorpi primari recettore-selettivi al fine di legare in maniera selettiva i singoli protomeri e poi gli anticorpi secondari specie specifici rappresentati da sonde per PLAs (Trifilieff et al. 2011; Callén et al. 2012). Queste sonde sono costituite da sequenze oligonucleotidiche complementari legati a molecole fluorescenti. Se gli anticorpi per i due protomeri presi in esame sono posti a una distanza inferiore ai 17 nm, le sonde possono legarsi tra loro e dare un segnale unico e rilevabile tramite microscopia a fluorescenza. Se invece i protomeri sono posti a una distanza maggiore tra loro non si genererà alcun segnale fluorescente e quindi si potrà dimostrare che i protomeri non possono essere considerati come unica unità eteromerica. Nello studio di recettori A2A e D2 oggetto di questa tesi sono state acquisite immagini di fluorescenza che consentono la visualizzazione dell'eteromero del recettore A2A-D2 mediante fluorescenza verde ottenuta tramite microscopia confocale applicando la tecnica PLA. Questo aspetto è stato trattato in maniera più approfondita nei capitoli “Materiali e Metodi” e “Risultati” riportati in seguito.

La PLA è una tecnica di prima scelta che basa il suo successo sulla qualità del tessuto prelevato,

la specificità e il carattere bivalente degli anticorpi primari e l'uso di appropriati controlli (Fuxe et al. 2014a). Tuttavia, è importante sottolineare come questi ultimi debbano comprendere la presenza del segnale PLA solo nei tessuti di animali *wilde-type* ma non in sezioni di animali in cui venga a mancare uno dei due protomeri recettoriali o quando la PLA venga eseguita in assenza di uno degli anticorpi primari (controllo negativo). Il problema della cross-reattività degli anticorpi è superato dal duplice riconoscimento delle sonde per PLA e questo permette di osservare un segnale anche quando in analisi immunofluorescenza o immunohistochimica si possono avere problemi con gli anticorpi primari. Resta però il fatto che entrambi gli epitopi antigenici siti sui rispettivi protomeri devono risultare accessibili e non impediti dalla stessa interazione proteina-proteina (Koos et al. 2014).



**Illustrazione dei processi implicati nella PLA.**

(A) Due anticorpi primari riconoscono in maniera specifica gli epitopi delle due proteine di interesse nella cellula. Le proteine di interesse, che potenzialmente interagiscono tra loro, sono schematizzate dai due globuli, giallo e verde, e su di esse si vanno a legare i rispettivi anticorpi primari. (B) Gli anticorpi secondari accoppiati a oligonucleotidi (le sonde di PLA) si legano agli anticorpi primari. (C) Quando le sonde di PLA legate agli anticorpi secondari si trovano a una certa distanza, gli oligonucleotidi si appaiano. (D) Il DNA circolare e chiuso risultante viene amplificato dalla DNA polimerasi. (E) Gli oligonucleotidi legati ai fluorocromi si ibridano con le sequenze ripetute. (F) I segnali di PLA vengono rilevati mediante microscopia fluorescente come punti distinti e forniscono dati sulla localizzazione intracellulare delle proteine o sulla loro interazione fisiche

### 1.3.4 CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE E WESTERN BLOT

Per dimostrare la co-localizzazione recettoriale dei protomeri GPCRs e quindi la formazione di un loro complesso, la co-immunoprecipitazione è la principale tecnica utilizzata, anche se questa metodica ma non rileva la vicendevole modulazione allosterica dei protomeri.

Le membrane cellulari vengono solubilizzate e successivamente le proteine vengono esposte ad un anticorpo specifico per un singolo protomero. Questo anticorpo farà immunoprecipitare il protomero target dell'anticorpo primario e con esso l'eventuale protomero che interagisce nella formazione del complesso recettoriale. Il materiale immunoprecipitato viene poi sottoposto all'analisi western blot, tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, utilizzando anticorpi specifici per il protomero partner (Berggard et al. 2007; Gomes et al. 2013b). Un requisito importante per l'utilizzo di questa tecnica è la scelta di un anticorpo selettivo per il protomero che si decide di precipitare: se infatti il processo di immunoprecipitazione non è ottimale e viene a mancare, non è possibile raccogliere in maniera efficiente l'immunoprecipitato e quindi non è possibile proseguire con l'analisi. La selettività degli anticorpi primari deve essere dimostrata su tessuti *wilde-type* e su animali con singoli protomeri mancanti.

Questa tecnica è stata utilizzata anche in questa tesi (vedi Materiali e Metodi ed il capitolo Risultati).

### 1.3.5 UTILIZZO DI RADIOLIGANDI PER LA VALUTAZIONE DI ALTERAZIONI NEL BINDING PER LIGANDI SPECIFICI

I saggi di *binding* recettoriale sono utilizzati in diversi ambiti scientifici come nella caratterizzazione di bersagli dei farmaci più noti poiché rappresentano una componente fondamentale nell'identificazione di molecole e nel successivo processo della loro caratterizzazione.

Questi saggi vengono utilizzati anche per studiare le proprietà recettoriali di un eteromero, avvalendosi dell'utilizzo dei radioligandi. Le alterazioni osservabili ed elencate in seguito indicano che l'eteromerizzazione è in grado di modulare allostericamente la funzione recettoriale.

Dai saggi di *binding* sono state rilevate alterazioni delle proprietà di legame dei ligandi protomero-selettivi dovute all'eteromerizzazione di GPCRs: ad esempio è possibile osservare

- (a) aumento/diminuzione dell'affinità di legame di ligandi protomero-selettivi;
- (b) aumento/diminuzione di affinità di legame di ligandi selettivi per un protomero senza alterazione di affinità per ligandi del protomero partner (Pfeiffer et al. 2003; Wang et al. 2005);
- (c) aumento/diminuzione dell'affinità di ligandi selettivi per un protomero in presenza di un ligando associato al protomero partner (osservato ad esempio nei complessi A2A-D2; Ferré et al. 1991; Dasgupta et al. 1996; Pfeiffer et al. 2003; Albizu et al. 2011);
- (d) cooperatività di legame, sia positiva che negativa, utilizzando una combinazione di ligandi per ciascun protomero (Jordan et al. 1999; Sohy et al. 2009; Gonzalez et al. 2012).

### 1.3.6 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ DI SIGNALING PER PROTOMERI ED ETROMERI

La valutazione del *signaling* può essere determinante per comprendere se l'eteromerizzazione altera la trasduzione del segnale relativa ai singoli protomeri.

I cambiamenti osservabili includono:

- (a) la presenza di un protomero aumenta/diminuisce il *signaling* del protomero partner (McGraw et al. 2006);
- (b) l'agonista di un protomero attiva il *signaling* attraverso una proteina G diversa nelle cellule che esprimono l'eteromero rispetto alle cellule che esprimono l'omomero (George et al. 2000; Fan et al. 2005; Kern et al. 2012; Kabli et al. 2014);
- (c) il percorso di *signaling* attivato dall'eteromero e la sua localizzazione sono diversi da quelli attivati da ciascun protomero (George et al. 2000; Charles et al. 2003; Rozenfeld et al. 2007; 2012; Lin et al. 2013; Bellot et al. 2015);
- (d) c'è una diminuzione della potenza dell'agonista per un protomero (Rozenfeld et al. 2012; Wang et al. 2005);
- (e) con una combinazione di agonisti per entrambi i protomeri vi è un aumento/diminuzione di *signaling* (Jordan et al. 1999; Rios et al. 2006; Ayoub et al. 2015);
- (f) una combinazione di agonisti per entrambi i protomeri non riesce a generare (Pello et al. 2008) o porta ad un *signaling* diverso da quella dei protomeri individuali (Bellot et al. 2015);
- (g) un antagonista di un protomero blocca il *signaling* attraverso il protomero partner, come visto per gli eteromeri A2A-CB1, A2A-D2 (Cervetto et al. 2016 e 2017), o nel caso dei recettori per le chemochine, CCR2-CCR5 / CXCR4 (Carriba et al. 2007; Sohy et al. 2007; 2009; Moreno

et al. 2013; Chow et al. 2014);

(h) l'uso combinato di antagonisti di entrambi i protomeri blocca il *signaling* dell'eteromero (Leger et al. 2006; Ayoub et al. 2015).

Nella maggioranza dei casi questi cambiamenti potrebbero derivare da un fenomeno di “*signaling crosstalk*” e non direttamente dalla modulazione del recettore allosterico. Solo studi con reagenti in grado di bloccare o distruggere selettivamente l'eteromero sarebbero dirimenti.

### 1.3.7 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ DI TRAFFICKING PER PROTOMERI ED ETROMERI

Nell'ambito delle indagini sugli eteromeri su cellule eterologhe alcuni studi hanno valutato le proprietà di *trafficking* dei protomeri del complesso eteromerico includendo indagini sulla formazione degli eteromeri e sulla loro internalizzazione, eventualmente mediata da agonisti. Relativamente al *trafficking* di eteromeri dalla superficie cellulare si sono potuti constatare diversi comportamenti:

(a) cambiamento della localizzazione da un compartimento intracellulare alla superficie di un protomero per la presenza di un protomero partner (Rozenfeld et al. 2012);

(b) alterazione dell'internalizzazione di un protomero in seguito al legame dell'agonista del protomero partner (Jordan et al. 1999; Lin et al. 2013);

(c) internalizzazione del complesso eteromerico da parte di alcuni ma non tutti gli agonisti di un singolo protomero (Law et al. 2005; Hasbi et al. 2007; He et al. 2011) oppure internalizzazione del complesso eteromerico da parte di un agonista di un protomero, ma non del protomero partner (Pfeiffer et al. 2002; Liu et al. 2011);

(d) internalizzazione del protomero partner da parte dell'agonista di un protomero (ad esempio nell'eteromero A2A-D2) (Hillion et al. 2002; Torvinen et al. 2005; Liu et al. 2011);

(e) il *trafficking* dei protomeri è cambiato da uno scomparto di riciclo (per omomeri del recettore) ad un comparto degradativo (ad esempio, gli eteromeri dei recettori per gli oppioidi (OR)  $\delta$ OR- $\mu$ OR e dei recettori per la vasopressina (VR) V1aR-V2R (Terrillon et al. 2004; He et al. 2011; Milan-Lobo et al. 2011);

(f) alterazioni nel reclutamento di  $\beta$ -arrestina e dei segnali mediati da  $\beta$ -arrestina in seguito al trattamento con agonisti (Decaillot et al. 2011; Mustafa et al. 2012; Bellot et al. 2015).

Diversi studi indicano che non solo l'internalizzazione dei recettori, ma anche l'espressione sulla superficie cellulare degli eteromeri sembra essere modulata in modo differenziato (Bulenger et al. 2005). Questi studi sostengono l'idea che gli eteromeri vadano incontro a maturazione in un modo distinto da quello dei protomeri e che varie proteine chaperone siano in grado di facilitare questi eventi di formazione e maturazione di eteromeri (Hammad et al. 2010; Decaillot et al. 2008).

### **1.3.8 STUDIO FUNZIONALE DELLE PROPRIETÀ DEGLI ETEROMERI CON ANTICORPI ETEROMERO-SELETTIVI E LIGANDI BIVALENTI**

Anticorpi selettivi e ligandi bivalenti (con due porzioni farmacofore selettive per i protomeri implicati nella formazione di un eteromero) permettono di individuare eteromeri in condizioni normali e patologiche. Studi diversi hanno rilevato come gli eteromeri di GPCR possano essere rilevati grazie ad anticorpi eteromero-selettivi (ma non nei singoli protomeri), utili nel rilevamento di eteromeri in condizioni patologiche (Gupta et al. 2010; Rozenfeld et al. 2011; Bushlin et al. 2012.). Questi anticorpi sono anche in grado di bloccare il *signaling* mediato da eteromeri di cui ne determinano espressione e regolazione grazie al riconoscimento di un epitopo eteromero-specifico, di stabilizzare interazioni, anche di tipo transitorio, tra protomeri rendendo talvolta poco attendibili le interpretazioni dei risultati.

I ligandi bivalenti sono stati progettati cercando di generare molecole che dispongano di una porzione farmacoforo-selettiva per un protomero distanziata, grazie alla presenza di una porzione di molecola chiama distanziatore, da una seconda porzione farmacoforo-selettiva per il protomero partner. Queste molecole sono state utilizzate in particolare per studiare gli eteromeri in cui uno dei protomeri è  $\mu$ OR (Daniels et al. 2005; Lenard et al. 2007; Le Naour et al. 2013; Yuan et al. 2013).

### 1.3.9 STUDIO FUNZIONALE DELLE PROPRIETÀ DEGLI ETEROMERI CON ANIMALI TRANSGENICI

Per ottenere evidenze funzionali *in vivo* sull'eteromerizzazione di protomeri sono stati anche utilizzati animali transgenici. Questi esprimono singoli protomeri del recettore che quindi non possono dimerizzare. Gonzalez e colleghi dimostrarono *in vivo* l'interazione tra i recettori D2 e D4 per la dopamina e che la perdita della loro interazione influenzava la liberazione del neurotrasmettitore e conseguentemente poteva avere un ruolo in patologie che coinvolgono il D4 (González et al. 2012).

Moreno e colleghi dimostrarono che gli eteromeri 5-HT<sub>2A</sub> (recettore per la serotonina) -mGlu<sub>2</sub> (recettore metabotropo per il glutammato) hanno un ruolo nelle psicosi indotte da allucinogeni (Moreno et al. 2012).

Questi studi dimostrano così che la perdita di complessi funzionali eteromerici ha effetti funzionali in quanto si osservano alterazioni farmacologiche, di signaling e di trafficking degli stessi complessi recettoriali.

## 1.4 ADENOSINA ED ETERODIMERI A2A-D2 IN TESSUTI NATIVI

L'adenosina extracellulare, importante trasmettitore del SNC, modula la neurotrasmissione dopaminergica e glutammatergica (Ferrè et al. 2005; 2007a, c). L'azione dell'adenosina si esplica attraverso l'interazione con diversi GPCRs che sono stati classificati come:

- recettore A1 è ampiamente distribuito in molte aree cerebrali, accoppiato ad una proteina G di tipo inibitore (Gi) la cui attivazione determina un effetto inibitorio sull'enzima adenilato-ciclastasi;
- recettore A2A, accoppiato a una proteina G stimolatoria (Gs) e molto presente nello striato (Fredholm et al. 2001; Schiffmann et al. 2007);
- recettore A2B, accoppiato a una proteina Gs;
- recettore A3, accoppiato a una isoforma della proteina Gi Nello striato, area di interesse per lo svolgimento della mia tesi sperimentale, l'adenosina svolge il suo compito di trasmettitore agendo sui suoi recettori capaci di eteromerizzare tra loro, o con altri GPCRs come i recettori per dopamina, glutammato, cannabinoidi e ATP (Ginès et al. 2000; Ciruela et al. 2001; 2006; Yoshioka et al. 2001; Ferrè et al. 2002; 2007c; Hillion et al. 2002; Agnati et al. 2003; Canals et al. 2003; Carriba et al. 2007).

Nel resto dell'introduzione mi occuperò solo degli eteromeri A2A-D2 per cui sono state trovate evidenze relativamente a tutti i tre criteri sopra descritti e poi tratterò in particolare le prove ottenute in un'area particolare del SNC, lo striato, su cui ho lavorato.

### **1.4.1 ETEROMERO A2A-D2 E LE PROVE PER LA SODDISFAZIONE DEI TRE CRITERI.**

L'eteromerizzazione A2A-D2 è frutto di un'interazione elettrostatica tra un epitopo ricco in arginine nel segmento N-terminale del terzo loop intracellulare del recettore D2 ed un gruppo fosfato nel C-terminale del recettore A2A (Canals et al. 2003; Ciruela et al. 2004; Woods et al. 2005). Queste evidenze sono state dimostrate in un primo momento in studi che si sono avvalsi di tecniche come la co-immunoprecipitazione e tecniche FRET e BRET (Canals et al. 2003; Kamiya et al. 2003) svolte su cellule di mammifero trasfettate. Successivamente grazie a tecniche computazionali più innovative e grazie alla spettroscopia di massa questo tipo di interazione elettrostatica è stata confermata.

Luigi Agnati e Kjell Fuxe (Agnati et al. 2003) furono i primi a introdurre, in seguito a studi svolti in preparazioni di membrane derivanti da tessuto cerebrale o da cellule trasfettate, il concetto di "Interazione intramembrana tra recettori". Quest'ultima spiega come la stimolazione di un recettore sia in grado di cambiare le caratteristiche di legame di un recettore adiacente, andando a costituire una delle caratteristiche comuni degli eteromeri recettoriali (Ferrè et al. 1997; 2007b, c; Franco et al. 2007).

### **1.4.2 ETERODIMERI A2A-D2 NELLO STRIATO: IL CONCETTO DI INTERAZIONE INTRAMEMBRANA TRA RECETTORI**

Diversi gruppi di ricerca hanno traslato il concetto di interazione intramembranale tra recettori sul rapporto di agonismo/antagonismo reciproco dei recettori A2A e D2. Questi ricoprono un ruolo di rilievo perché implicati nel controllo del rilascio di glutammato, il principale trasmettitore eccitatorio che va ad intervenire in malattie legate alla psicosi umana e nel morbo di Parkinson. Gli studi relativi a questi recettori si sono svolti su preparazioni di membrane derivanti da diverse linee cellulari transfettate e da striato umano e di ratto (Ferrè et al. 1991a; Dasgupta et al. 1996; Dixon et al. 1997; Kull et al. 1997; Salim et al. 2000; Dìaz-Cabiale et al. 2001; Kudlacek et al. 2003). In particolare:

- è stato possibile dimostrare come i recettori A2A possano essere in grado di controllare l'azione dei recettori D2 sul rilascio di neurotrasmettitori in neuroni GABAergici

- enkefalinergici. Aggiungendo un agonista selettivo A2A infatti, questo non produce da solo effetti significativi ma si comporta da antagonista dei recettori D2 andando a diminuire l'abilità della dopamina (o di un agonista del recettore D2) di spiazzare un radioligando D2 selettivo (Ferrè et al. 1991a; Dasgupta et al. 1996; Dixon et al. 1997; Kull et al. 1997; Salim et al. 2000; Diaz-Cabiale et al. 2001; Kudlacek et al. 2003) e andando ad aumentare i livelli extracellulari di GABA nel globo pallido ventrale ipsilaterale (Ferrè et al. 1994);
- è stato possibile dimostrare, grazie alla microdialisi *in vivo*, che la perfusione di un agonista D2 nello striato dorsale a livello dei corpi cellulari dei neuroni enkefalinergici comporta una diminuzione dei livelli di GABA nel globo pallido ipsilaterale con riduzione del rilascio di neurotrasmettitore dai terminali nervosi di tali neuroni inibitori (Ferrè et al. 1993) nel nucleus accumbens (striato ventrale). Gli aspetti relativi agli effetti che il recettore D2 può conseguire sono approfonditi nel capitolo seguente, dove verrà trattata la sua azione sui secondi messaggeri.

Le conclusioni dei punti sopracitati possono essere utilizzate nel campo farmaceutico in merito alla cura della malattia di Parkinson la cui patogenesi è legata ad un calo consistente dei livelli di dopamina. Di conseguenza, gli effetti del farmaco L-DOPA o degli agonisti del recettore D2 (Ferrè et al. 1992) potrebbero essere potenziati dagli antagonisti del recettore A2A con conseguente aumento del rilascio di dopamina. Agonisti e antagonisti selettivi del recettore A2A rispettivamente contrastano o potenziano l'attivazione motoria indotta da agonisti del recettore dopaminergico D2 (Ferrè et al. 1991b, c; 2001; Rimondini et al. 1998; Stromberg et al. 2000) andando ad agire in maniera speculare sulle alterazioni comportamentali.

Come riportato all'inizio di questo capitolo, l'eteromerizzazione A2A-D2 è frutto di un'interazione elettrostatica tra epitopi i quali possono formare peptidi. Questi possono contrastare la capacità dei recettori A2A attivati di antagonizzare gli effetti dell'attivazione dei recettori D2, rendendo l'eteromerizzazione tra recettori necessaria per il controllo da parte dei recettori A2A della modulazione dell'eccitabilità dei neuroni GABAergici enkefalinergici operata dai recettori D2 (Borroto-Escuela et al. 2011; Woods et al. 2005).

### **1.4.3 A2A-D2: LA MODULAZIONE DI D2 SUI RECETTORI A2A**

L'interazione recettoriale tra A2A e D2 è stata rilevata in diverse localizzazioni.

Nella stessa linea cellulare è stato possibile dimostrare grazie a studi di *binding* con radioligandi l'esistenza di un'interazione intramembrana antagonista A2A-D2. Il recettore D2 che di per sé non produce effetti significativi (aspetto già riscontrato in precedenza sui recettori A2A) se accoppiato a proteine Gi/o si comporta da antagonista nei confronti di A2A. Quest'ultimo in condizioni standard agisce stimolando l'adenilato-ciclastasi ed attivando la via di *signaling* cAMP-PKA (protein chinasi A), con la conseguente fosforilazione di parecchi substrati di PKA ed aumento nell'espressione di geni come c-fos e preproenkefalina nei neuroni GABAergici encefalinergici (Ferrè et al. 1997; 2007a, b, c; Agnati et al. 2003; Schiffmann et al. 2007). Il recettore D2 dunque va a contrastare l'aumento di cAMP indotto da A2A. Quest'ultimo aspetto è stato confermato anche da studi svolti anche nella linea cellulare umana di neuroblastoma SH-SY5Y dove anche in questo caso il recettore D2 contrasta l'azione di A2A (Hillion et al. 2002), confermando la presenza dell'eteromero.

L'interazione intramembrana A2A-D2 è stata rilevata anche a livello delle cellule nervose e questo aspetto è stato dimostrato con prove di *binding* con radioligandi. In questo caso, D2 antagonizza il rilascio degli ioni calcio attraverso i canali al calcio voltaggio dipendenti del tipo L. Questi ultimi sono stimolati in condizioni standard dal recettore A2A e quindi per proprietà transitiva, l'inibizione del loro rilascio è connessa anche in questo caso all'antagonizzazione del recettore di tipo A2A. Questo è probabilmente lo stesso meccanismo con il quale l'interazione A2A-D2 controlla l'eccitabilità dei neuroni GABAergici encefalinergici. In condizioni normali dunque, vi è una forte attivazione tonica dei recettori D2 che sono in grado di bloccare il *signaling* rilasciato dall'attivazione dei recettori A2A da parte dell'adenosina endogena (Svenningsson et al. 2000; Hakansson et al. 2006) e ciò determina il blocco della capacità dei recettori A2A di attivare la via cAMP-PKA con conseguente mancanza di fosforilazione di diversi substrati.

Quest'ultima evidenza è stata verificata con una controprova, svoltasi tramite ulteriori studi su tessuto striatale di roditore, dove la somministrazione di un antagonista del recettore D2 ha determinato un incremento di fosforilazioni PKA-dipendenti di DARPP-32 o di recettori AMPA e un incremento nell'espressione dei geni per c-fos e preproenkefalina.

Esistono pertanto prove della coesistenza di due interazioni reciproche antagoniste tra i recettori A2A e D2 nei neuroni encefalinergici GABAergici:

- una prima interazione intramembranale che modula l'eccitabilità neuronale ed il rilascio di neurotrasmettitore ed è dipendente dall'eteromerizzazione tra A2A e D2: la co-stimolazione dei

recettori A2A e D2 implica un'inibizione simultanea della modulazione dell'eccitabilità neuronale controllata dal recettore D2 da parte del recettore A2A;

- una seconda interazione antagonista a livello del secondo messaggero adenilato-ciclastasi, che modula la fosforilazione delle proteine e l'espressione genica: si tratta di un'inibizione, mediata dal recettore D2, della modulazione dell'espressione genica ad opera del recettore A2A.

#### **1.4.4 A2A-D2: DISSOCIAZIONE FUNZIONALE TRA L'ECCITABILITÀ NEURONALE E L'ESPRESSIONE GENICA**

Come riportato alla fine del capitolo precedente, è possibile affermare l'esistenza di una dissociazione funzionale tra l'eccitabilità neuronale e l'espressione genica.

Il primo meccanismo d'azione a supporto di questa evidenza presuppone un legame della proteina G a diversi gruppi di recettori D2:

- D2, se non forma un eteromero, può essere accoppiato a proteine G inibitorie e può inibire l'azione dell'adenilato ciclastasi;
- D2 se forma un eteromero con D1, recettore molto simile ad A2A, è accoppiato a proteine G stimolatorie ed a PLC e può incrementare l'azione dell'adenilato ciclastasi.

L'incapacità degli eteromeri del recettore D2 di innescare un *signalling* tramite legame alla proteina G<sub>i</sub> se legata al recettore A2A, è connessa all'azione dei recettori A2A e D2 che se non formano eteromeri ma si presentano sottoforma di omodimeri, vanno a legarsi a una sola proteina G eteromera (Banères et al. 2003; Liang et al. 2003; Herrick-Davis et al. 2005). Questo *linker* recettoriale avviene grazie a una particolare regione intracellulare che nel caso del recettore D2 è costituita da un epitopo ricco in arginine nel III loop intracellulare. Questo epitopo ha una duplice funzione poiché permette sia il legame con la proteina G<sub>i</sub>, sia con la calmodulina, sia con la porzione C-terminale dei recettori A2A (Bofill-Cardona et al. 2000; Canals et al. 2003; Ciruela et al. 2004; Woods et al. 2005; Liu et al. 2007).

Il secondo meccanismo a sostegno della coesistenza dell'interazione reciproca e antagonista tra A2A e D2 si basa sulla capacità del primo di legarsi ai recettori mGluR5 formando eteromeri (Ferrè et al. 2002). La formazione del complesso A2A-D2-mGluR5 è stata dimostrata essere a capo della modulazione della funzione di neuroni GABAergici encefalinerfici del nucleo accumbens ed è stata rilevata in modelli per la malattia di Parkinson (Popoli et al. 2001; Kachroo et al. 2005). Esperimenti in vivo sono stati condotti somministrando a livello centrale

gli agonisti per i recettori A2A e mGluR5 capaci di eliminare il controllo inibitorio mediato dai recettori D2. Queste multiple interazioni sono oggi alla base di moltissimi studi relativi a malattie legate alla psicosi umana e nel morbo di Parkinson.

### **1.4.5 A2A-D2 NEGLI ASTROCITI STRIATALI: PROVE DI ETEROMERIZZAZIONE**

Per quanto riguarda le prove relative alla presenza di eteromeri A2A-D2 negli astrociti striatali nativi si devono ricordare gli studi condotti proprio nel laboratorio della Prof Marcoli in cui ho svolto la mia tesi.

In particolare, in processi astrocitari (gliosomi) preparati da tessuto striatale di ratto adulto sono stati individuati i singoli protomeri con tecniche di immunoimaging su gliosomi purificati e marcati con i marker specifici come GFAP ed ezrin (Cervetto et al., 2016 e 2017). Su singoli processi GFAP od ezrin, nonché VGLUT1 (*vesicular glutamate transporter type 1*) positivi sono stati infatti trovati sia recettori A2A che D2, usando diversi anticorpi primari, per evitare di incorrere in falsi positivi. La co-localizzazione ottenuta con immunofluorescenza e microscopia confocale non era però in grado di soddisfare pienamente il criterio 1 in quanto le evidenze ottenute non erano indicative del fatto che i due protomeri si trovassero a distanza inferiore ai 17nm, distanza fisica per avere l'iterazione recettore-recettore.

Per quanto riguarda le caratteristiche biochimiche e di *signalling* specifiche del singolo protomero e del potenziale eteromero, in gliosomi striatali di ratto l'attivazione del recettore D2 era capace di inibire il rilascio di glutammato evocato da stimolo depolarizzante, in esperimenti di perfusione. Tale effetto era effettivamente mediato dall'attivazione del recettore D2 in quanto l'antagonista sulpiride annullava l'effetto dell'agonista quinpirolo. L'attivazione del recettore A2A non era capace di modulare il rilascio di glutammato evocato da stimolo depolarizzante. Se però l'agonista A2A era presente in contemporanea all'agonista D2 si poteva osservare una riduzione del rilascio di gliotrasmettitore, che veniva riportato al valore di controllo quando si antagonizzava il recettore A2A. di conseguenza dal punto di vista funzionale l'eteromero A2A-D2 ha proprietà distinte da quelle dei singoli protomeri, soddisfacendo il criterio 2.

Infine, l'uso di un peptide interferente ha permesso di ottenere la prova per soddisfare il criterio 3 e quindi dimostrando che la rottura dell'eteromero modificava le proprietà biochimiche e di

*signalling* (Cervetto et al. 2016).

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi era dimostrare che i recettori A2A e D2 non sono semplicemente co-localizzati a livello astrocitario ma che possono interagire fisicamente, direttamente o attraverso proteine agendo come modulatori allosterici vicendevolmente andando a formare un eteromero. L'obiettivo era quindi quello di ottenere delle evidenze fisiche della interazione dei singoli protomeri per poter soddisfare a pieno il primo criterio indicato da Gomes.

Nello striato, i recettori A2A e D2, così come l'eteromero A2A-D2 sono stati oggetto di importanti studi: in primis nei processi astrocitari dello striato adulto è stata in particolare dimostrata la presenza di recettori D2 per la dopamina (Bal et al. 1994; Miyazaki et al. 2004) e A2A per l'adenosina (Matos et al. 2013). In secondo luogo, questi studi ci hanno portato ad ipotizzare che i recettori A2A e D2, se espressi sulla membrana degli astrociti dello striato, potessero essere in grado, interagendo tra loro, di influenzare il rilascio di glutammato, il principale trasmettitore eccitatorio noto per avere un ruolo chiave in numerosi processi fisiologici che intervengono in malattie legate alla psicosi umana ma non solo. Questi risultati hanno aperto nuove prospettive sui meccanismi molecolari coinvolti tanto nella schizofrenia quanto nella malattia di Parkinson e nelle discinesie farmaco-indotte, fornendo nuovi target per farmaci antipsicotici e antiparkinson (Soriano et al. 2009; Fuxe et al. 2014b; 2015b; Guidolin et al. 2015).

In pazienti schizofrenici sono state riportate evidenze di neuroinfiammazione e di astrociti reattivi nella corteccia prefrontale (Catts et al. 2014) e si è potuta constatare una disfunzione astrocitaria e un'alterata trasmissione glutammatergica nello striato (Mitterauer 2014; Xia et al. 2014; Bernstein et al. 2015). È interessante notare come, in vivo, i recettori astrocitari D2 siano coinvolti nei disturbi associati all'infiammazione, modulando la risposta immune e aumentando la resistenza dei neuroni dopaminergici della sostanza nigra al danno neurotossico (Shao et al. 2013), mentre i recettori A2A gliali dello striato sembrano possedere un ruolo di protezione contro fenomeni neurotossici (Yu et al. 2008). Diversamente, nella schizofrenia i recettori A2A striatali sono sovra-regolati (Kurumaji and Toru 1998; Boison et al. 2012) ed una loro disfunzione altera l'omeostasi del glutammato, con possibile rilevanza nella patologia neuropsichiatrica (Rial et al. 2014; Matos et al. 2015).

# 3. MATERIALI E METODI

## 3.1 ANIMALI

Per gli esperimenti qui riportati sono stati utilizzati ratti adulti Sprague-Dawley maschi dal peso indicativo di 200-250 g. I ratti sono stati allevati presso lo stabulario del Dipartimento di Farmacia (DIFAR) dell'Università di Genova, e avevano accesso libero ad acqua e ad una dieta standard in pellet. Le fasi di luce/buio (luce dalle 7.00 alle 19.00), la temperatura ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) ed umidità relativa costanti (50%) erano mantenute costanti e controllate tutto l'anno. I ratti erano alloggiati in gabbie standard e con a disposizione cassette per un arricchimento ambientale secondo la normativa vigente (D.L. n. 26/2014). Le procedure sperimentali e le cure degli animali adottate sono state condotte in conformità alla Direttiva del Parlamento Europeo del 22 settembre 2010 (2010/63 / UE) e al D.L. n. 26/2014 italiano, e, in Conformità al Decreto Ministeriale 116/1992, sono state notificate al Ministero italiano della Salute.

## 3.2 PREPARAZIONE DI PROCESSI ASTROCITARI PURIFICATI

Lo striato veniva velocemente posto in una soluzione fisiologica a  $4^\circ\text{C}$  per poi essere omogenato con un omogenizzatore vetro/teflon (clearance 0,25 mm) in 10 volumi di saccarosio 0,32 M tamponato a pH 7,4 con Tris/HCl (10 mM).

In accordo con il protocollo preparativo ottimizzato negli anni presso il laboratorio di Farmacologia e Tossicologia del Dipartimento di Farmacia al fine dell'isolamento e del prelievo di gliosomi, l'omogenato è stato sottoposto a centrifugata (5 min, 1000g;  $4^\circ\text{C}$ ), con lo scopo di rimuovere nuclei e detriti, e il sopranatante è stato stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll<sup>®</sup> (2, 6, 10 e 20% v/v in saccarosio tamponato con Tris). I gradienti sono quindi stati centrifugati (5 min, 33500 g;  $4^\circ\text{C}$ ). È stata recuperata la banda che si poteva osservare tra il 2%

e il 6% di Percoll<sup>®</sup>: a questo livello del gradiente infatti è possibile prelevare i gliosomi, processi astrocitari purificati contenenti vescicole cariche di gliotrasmettitore e competenti per la loro secrezione (Stigliani et al. 2006; Cervetto et al. 2015; 2016; 2017). I gliosomi sono quindi stati ulteriormente centrifugati per permettere l'allontanamento del saccarosio/Percoll<sup>®</sup> e la loro risospensione in soluzione fisiologica tamponata con fosfati (PBS) avente la seguente composizione in mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 (pH 7.4). I gliosomi striatali sono stati utilizzati sia in esperimenti con tecniche di immunofluorescenza e co-immunoprecipitazione per verificare la presenza dei recettori A2A e D2. Il dosaggio proteico è stato eseguito secondo metodo di Bradford (Bradford 1976).

### **3.3 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA E MICROSCOPIA CONFOCALE SU GLIOSOMI**

Gliosomi (15-20 µg per ogni campione) sono stati fissati in paraformaldeide al 2% per 15', permeabilizzati con Triton X-100 0.05% per 5', saturati con PBS con aggiunta di albumina 0.3% (p/v) e incubati per 60' con anticorpi primari diluiti in PBS con aggiunta di albumina 3% (p/v).

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: mouse o rabbit anti-proteina fibrillare acida (GFAP; 1:1000; Sigma-Aldrich); mouse anti-VGLUT1 (1:500; Synaptic Systems); mouse anti-A2A (1:200; Merck Millipore Corporation; 05-717); rabbit anti-A2A (1:200; Alomone Labs, Jerusalem, Israel; AAR-002); mouse anti-D2 (1:200; Merck Millipore Corporation; AB5084P); rabbit anti-D2 (1:200; Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden), rabbit anti-D2 (1:200; Alomone Labs; ADR-002) e mouse anti-ezrin (1:500; Sigma-Aldrich; E8897). Dopo l'incubazione per 60' a + 4°C con gli anticorpi primari è stato eseguito un lavaggio in PBS, mediante centrifugazione, e successivamente la preparazione è stata incubata per 60' con gli opportuni anticorpi secondari coniugati con i fluorofori 488, 546 o 633 (Alexa Fluor; 1:1000; Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) diluiti in PBS contenente albumina al 3% (p/v). Per l'acquisizione delle immagini al confocale è stato utilizzato un microscopio confocale a tre canali TCS SP2 laser-scanning (Leica Wetzlar, Germany), equipaggiato con spettri di eccitazione alle seguenti lunghezze d'onda: 458, 476, 488, 514, 543 e 633 nm.

Abbiamo considerato i segnali come localizzati nello stesso pixel se le loro rispettive intensità

(0–255, 8 bit) erano rigorosamente superiori alla soglia dei loro canali, come determinato analizzando gli istogrammi di colore (software ImageJ).

Per ogni anticorpo primario si è andato a valutare il dato come numero di particelle positive espresse come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di un numero compreso tra di 3-6 campi ottenuti da cinque diversi esperimenti in microscopia confocale mentre nel caso dell'immunofluorescenza si è andato a valutare il dato come numero di particelle positive espresse come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 7 campi ottenuti da quattro diversi esperimenti condotti su diverse preparazioni di gliosomi destinate all'esperimento.

È stato utilizzato il software ImageJ Fiji (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) e l'applicazione *3D-object count* per contare le singole particelle positive in ogni canale, considerando le dimensioni minime delle particelle e il background.

Per valutare la specificità degli anticorpi anti-A2A e anti-D2 sono stati condotti esperimenti pre-incubando l'anticorpo con il rispettivo peptide di controllo (fornito dalla ditta) e poi proseguendo l'esperimento come sopra descritto, portando ad una completa mancanza di colorazione al microscopio confocale, dal momento che l'anticorpo primario messo in contatto con i gliosomi risultava già legato al suo epitopo (dati non mostrati). Sono stati condotti altri esperimenti di controllo, omettendo o uno degli anticorpi primari quando si analizzavano campioni marcati in duplicato o triplicato oppure escludendo uno gli anticorpi secondari oppure utilizzando anticorpi secondari coniugati a fluorofori diversi (dati non mostrati).

## **3.4 ANALISI ULTRASTRUTTURALE E MICROSCOPIA ELETTRONICA SU GLIOSOMI**

Per le analisi ultrastrutturali, i gliosomi purificati sono stati fissati in glutaraldeide 2.5% in una soluzione di cacodilato 0.1M, pH 7.2, quindi in tetrossido di osmio 1% in una soluzione di cacodilato 0.1M, pH 7.2, marcati con uracile acetato 1% in soluzione acquosa e disidratati attraverso una serie graduata di etanolo. I campioni sono stati successivamente inclusi LX112 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), polimerizzati per 12 ore a 42° C e poi per 48 ore a 60° C. Sezioni ultrasottili Grey-silver sono state ottenute utilizzando un microtomo Leica Ultracut E, marcate con uracile acetato e piombo citrato e analizzate con microscopio elettronico FEI CM10 o Tecnai 12 G2 (FEI, Eindhoven, the Netherlands).

### **3.5 ANALISI WESTERN BLOT E CO- IMMUNOPRECIPITAZIONE DEI RECETTORI A2A E D2 IN MEMBRANE GLIOSOMIALI**

A partire dai gliosomi striatali (1mg/mL) sono state ottenute e lisate le membrane. I campioni sono stati lisati in soluzione di borato di sodio 50 mM, pH 7,5 con 1 mM di EDTA e inibitori di proteasi con tre cicli di congelamento e scongelamento seguiti da sonicazione. La quantificazione delle proteine del lisato è stata eseguita usando il metodo Bradford. Per eseguire l'immunoprecipitazione, il lisato è stato centrifugato a 100.000g per 30' a 4°C. Il pellet è stato lavato e quindi solubilizzato in 100µL di borato di sodio 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5 (tampone di immunoprecipitazione) + 1% Triton X-100 a 37°C per 1 ora. Quindi 400µL di tampone di immunoprecipitazione sono stati aggiunti al lisato per diluire il Triton X-100 allo 0,2% (totale delle membrane) e quindi centrifugati a 18.000g per 15' a 4°C. Il surnatante è stato trattato con proteina G-sefariosio e quindi incubato *overnight* con 1µg di anticorpo rabbit anti-A2A o rabbit anti- D2 a 4°C. La proteina G-sefariosio è stata quindi aggiunta al campione e incubata per 1 ora a temperatura ambiente. Gli immunocomplessi sono stati centrifugati a 400g e aliquote di surnatante sono state sottoposte a corsa elettroforetica SDS-PAGE. Gli immunocomplessi sono stati lavati tre volte con il tampone di immunoprecipitazione + 0,1% Triton X-100, bolliti nel *loading buffer* per 5 minuti e sottoposti a corsa elettroforetica con gel al 10% seguita da elettroblotting su una membrana di nitrocellulosa. Le membrane blottate sono state saturate con PBS pH 7,5 contenente il 5% di latte scremato in polvere. Le bande sono state analizzate con anticorpi specifici e il materiale immunoreattivo è stato rilevato con un apparato Bio-Rad Chemi Doc. Le bande immunoreattive sono state quantificate utilizzando il software Quantity One 4.6.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### **3.6 PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA) IN FETTINE STRIATALI DI RATTO ADULTO**

La PLA è stata eseguita su tessuto striatale di ratto usando gli anticorpi primari (mouse anti-A2A (1: 200, Merck Millipore Corporation, 05-717, Burlington, MA, USA); rabbit anti-D2R (1: 200, Alomone Labs, ADR-002, Gerusalemme, Israele); goat anti-GFAP (1: 500, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA, sc-6170), il kit PLA Duolink (DUO92014, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e anticorpo secondario anti-goat Alexa Fluor 546 (1: 500, Eugene, OR, USA). La PLA è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando il kit Duolink (DUO92014, DUO92001, DUO92005 Sigma-Aldrich). In breve, le fette sono state prima lavate due volte per 10 minuti in PBS, quindi bloccate con PBS addizionato di siero al 3% e Triton X-100 allo 0,2% in PBS per 1 ora in una camera umida a temperatura ambiente. Successivamente le fettine sono state permeabilizzate con 0,2% Triton X-100 in PBS per 15', lavate due volte in PBS per 10', bloccate *blocking solution* in camera umida per 30' a 37°C e quindi incubate overnight a 4°C con l'anticorpo primario (anti-A2A e anti-D2) in camera umida. Successivamente, le sezioni sono state risciacquate con PBS e incubate con anticorpi secondari specie-specifici coniugati con oligonucleotidi complementari per 1 ora a 37°C (DUO92001, DUO92005 Sigma-Aldrich). Dopo l'ibridazione, le fasi di legatura e amplificazione sono state eseguite utilizzando le istruzioni del produttore. Al microscopio confocale sono state acquisite immagini di fluorescenza che consentono la visualizzazione dell'eteromero A2A-D2 mediante fluorescenza verde.

Per l'analisi della co-localizzazione con GFAP, dopo la fase di amplificazione le fettine sono state incubate *overnight* a 4°C anche con l'anticorpo goat anti-GFAP in camera umida e successivamente 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor-546. I nuclei sono stati quindi marcati con DAPI. Dopo lavaggi in PBS, le sezioni sono state montate con una soluzione di glicerolo/PBS (1:1) ed esaminate al microscopio confocale a scansione laser (SP2 AOBS, Leica Microsystems, Mannheim, Germania). Sono stati condotti anche esperimenti di controllo negativo, evitando la coniugazione dell'anticorpo primario anti-A2A o anti-D2 con le sonde Duolink, cioè omettendo la presenza di uno dei due anticorpi primari, e hanno portato a una completa mancanza di colorazione (dati riportati in figura 8).

### **3.7 MATERIALI**

Triton<sup>®</sup> X-100 è stato acquistato da Sigma. Proteina G-sefariosio 4 Fast Flow, membrane di nitrocellulosa ed ECL SELECT<sup>®</sup> Detection System sono stati ottenuti da GE Healthcare. L'anticorpo primario guineapig e mouse anti-VGLUT1 sono stati comprati da Synaptic Systems, Goettingen, Germany. Gli anticorpi primari mouse anti-A2A e mouse anti-D2 sono stati acquistati dalla Merck Millipore Corporation (05-717; AB5084P); l'anticorpo primario

goat anti-GFAP è stato acquistato da Santa Cruz Biotechnology Inc. Gli anticorpi primari rabbit anti-A2A e anti-D2 sono stati acquistati da Alomone Labs (AAR-002; ADR-002) che ci ha fornito anche i peptidi per gli esperimenti di controllo degli anticorpi. Gli anticorpi secondari coniugati con i fluorofori 488, 546 o 633 (Alexa Fluor) sono stati comprati dalla Life Technologies Corporation; il cocktail degli inibitori di proteasi sono stati ottenuti da Cell Signaling Technology (Leiden, Paesi Bassi). Il kit per la PLA (Duolink: DUO92014, DUO92001, DUO92005), il Percoll<sup>®</sup>, l'anticorpo mouse anti-ezrin (E8897) e i sali necessari per la preparazione delle soluzioni tamponate sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

## **4. RISULTATI**

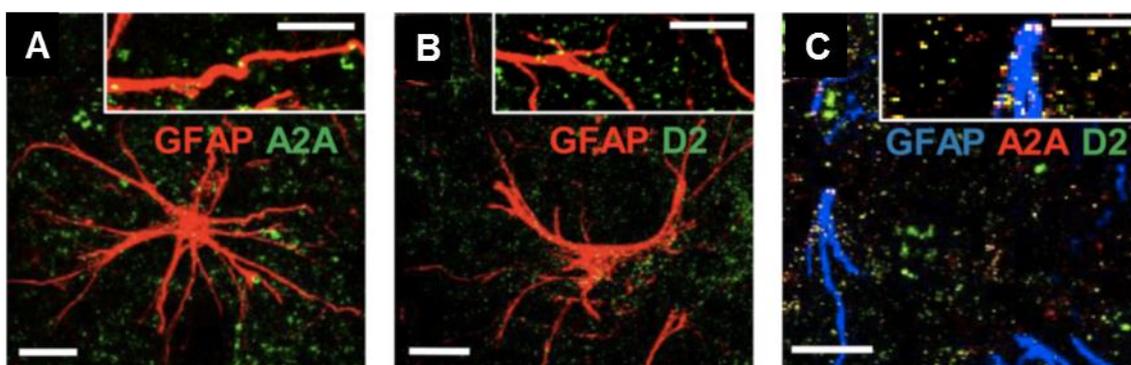
La prova definitiva dell'eterodimerizzazione dei recettori A2A e D2 in astrociti adulti si basa su

aspetti biochimici e biofisici ed evidenza la vicinanza spaziale delle molecole proteiche e l'interazione strutturale tra i recettori.

Grazie al contributo di questo lavoro sperimentale e con approcci di co-immunoprecipitazione, immunofluorescenza e *proximity ligation assay* (PLA) si è potuto ottenere, in astrociti nativi striali, prove biochimiche e biofisiche della capacità dei recettori A2A e D2 di eterodimerizzare. Le evidenze raccolte delineano nuovi aspetti fisiologici della regolazione della trasmissione del gliotrasmettitore glutammato da parte del sistema dopaminergico. Inoltre, questi dati forniscono indicazioni molecolari per lo sviluppo di nuove terapie anti-Parkinson.

## 4.1 GLI ASTROCITI DI STRIATO ESPRIMONO I RECETTORI A2A E D2

Analisi di immunistoichimica su fettine di striato di ratto adulto hanno dimostrato l'espressione dei recettori A2A e D2 sugli astrociti nativi, identificati grazie al marcatore specifico GFAP. Tali esperimenti hanno permesso di dimostrare che astrociti di striato GFAP+ esprimono sia i recettori A2A che i D2 e che questi recettori sono tra loro co-localizzati su strutture cellulari GFAP+ come si può osservare in **figura 1**. È da notare che questi esperimenti sono stati condotti su tessuto fresco isolato dallo striato di animali adulti e non da colture cellulari *in vitro*.



**FIGURA 1.** Co-localizzazione dei recettori A2A e D2 in astrociti striatali.

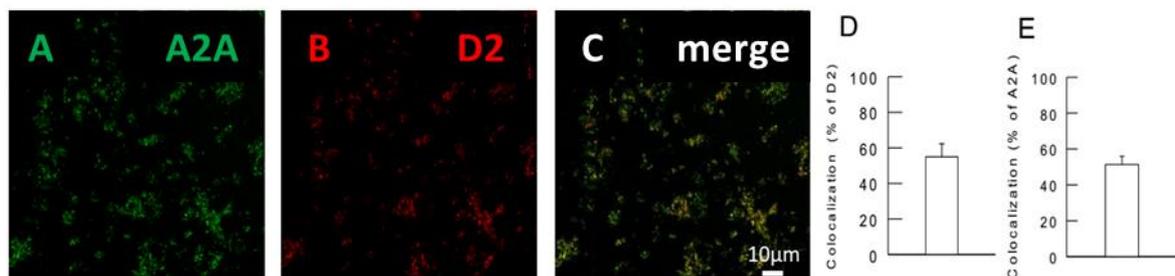
Le immagini riportate in figura sono rappresentative di quanto è stato osservato dall'analisi di immunofluorescenza condotta su fettine striatali e illustrano la co-localizzazione dei recettori per l'adenosina, A2A, e per la dopamina, D2, con cellule GFAP+. In particolare, le immagini **1a** e **1b** sono delle doppie-marcature e riportano in rosso la proteina GFAP, marker selettivo per gli astrociti, e in verde, rispettivamente, i recettori A2A e D2; è possibile quindi identificare in giallo i punti di co-localizzazione dei recettori A2A e D2 in cellule astrocitarie. All'interno delle immagini sono stati inseriti degli ingrandimenti per apprezzare meglio la co-localizzazione. L'immagine **1c** è invece esemplificativa di quanto ottenuto con una tripla marcatura e riporta in blu GFAP, in rosso il recettore A2A e in verde il D2: i punti di co-localizzazione di tutti i tre marcatori sono visibili come spot bianchi. All'interno della immagine è stato inserito un ingrandimento per apprezzare meglio la co-localizzazione.

Le scale bar misurano rispettivamente 10  $\mu\text{m}$  e 5  $\mu\text{m}$  nei pannelli e negli inserti.

Immagine tratta da Cervetto et al., 2018.

## 4.2 UNA SOTTOPOPOLAZIONE DI PROCESSI ASTROCITARI STRIATALI ESPRIME RECETTORI A2A E D2

Esperimenti di immunistochemica condotti su processi astrocitari marcati con anticorpi specifici per A2A e D2 hanno dimostrato che essi esprimono entrambi i recettori (**figura 2**).



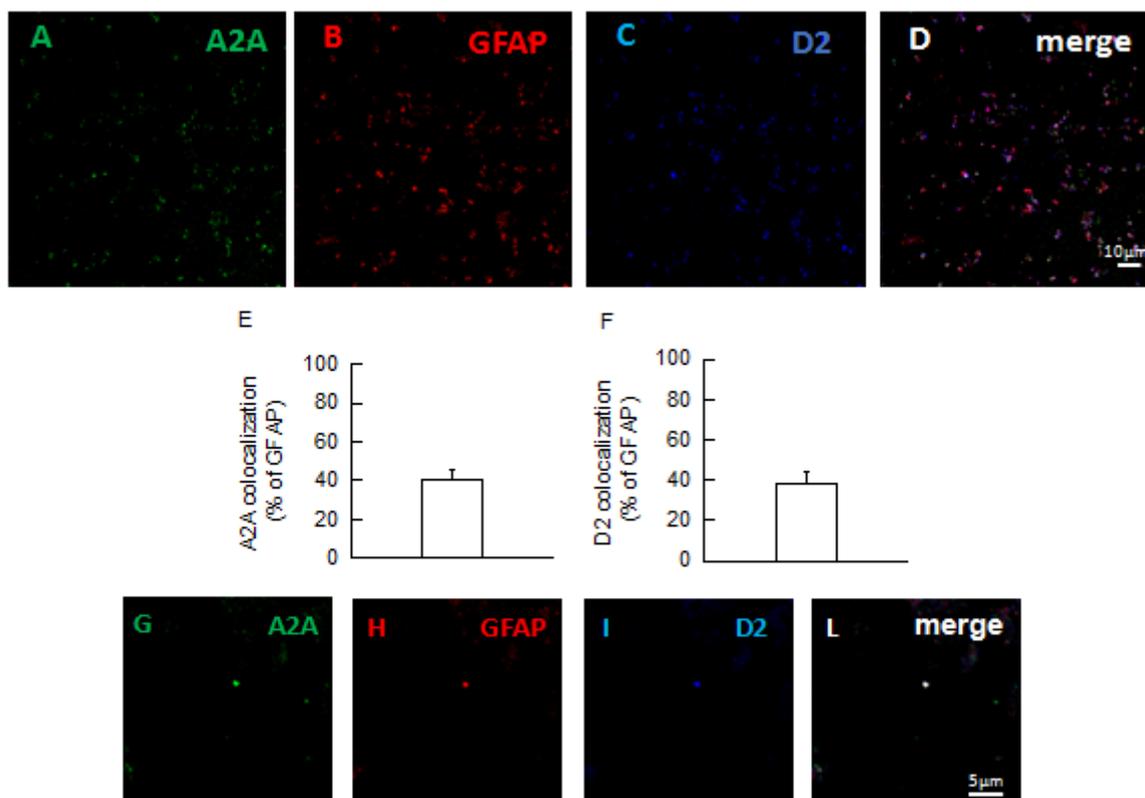
**FIGURA 2. Recettori A2A e D2 co-localizzano in gliosomi.**

Le immagini riportate in figura sono rappresentative di quanto è stato osservato dall'analisi di immunofluorescenza condotta su gliosomi striatali e illustrano la co-localizzazione dei recettori per l'adenosina, A2A, e per la dopamina, D2. In particolare, le immagini **2A** e **2B** sono delle marcature e riportano in verde i recettori A2A e in rosso D2; è possibile quindi identificare in giallo in **2C** i punti di co-localizzazione dei recettori A2A e D2 in gliosomi. Le scale bar misura 10 μm.

I grafici a barre (**2D** e **2E**) indicano le percentuali di co-localizzazione dei recettori A2A nella popolazione D2 e viceversa. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 7 campi ottenuti da quattro diversi esperimenti.

Immagine modificata da Cervetto et al., 2018.

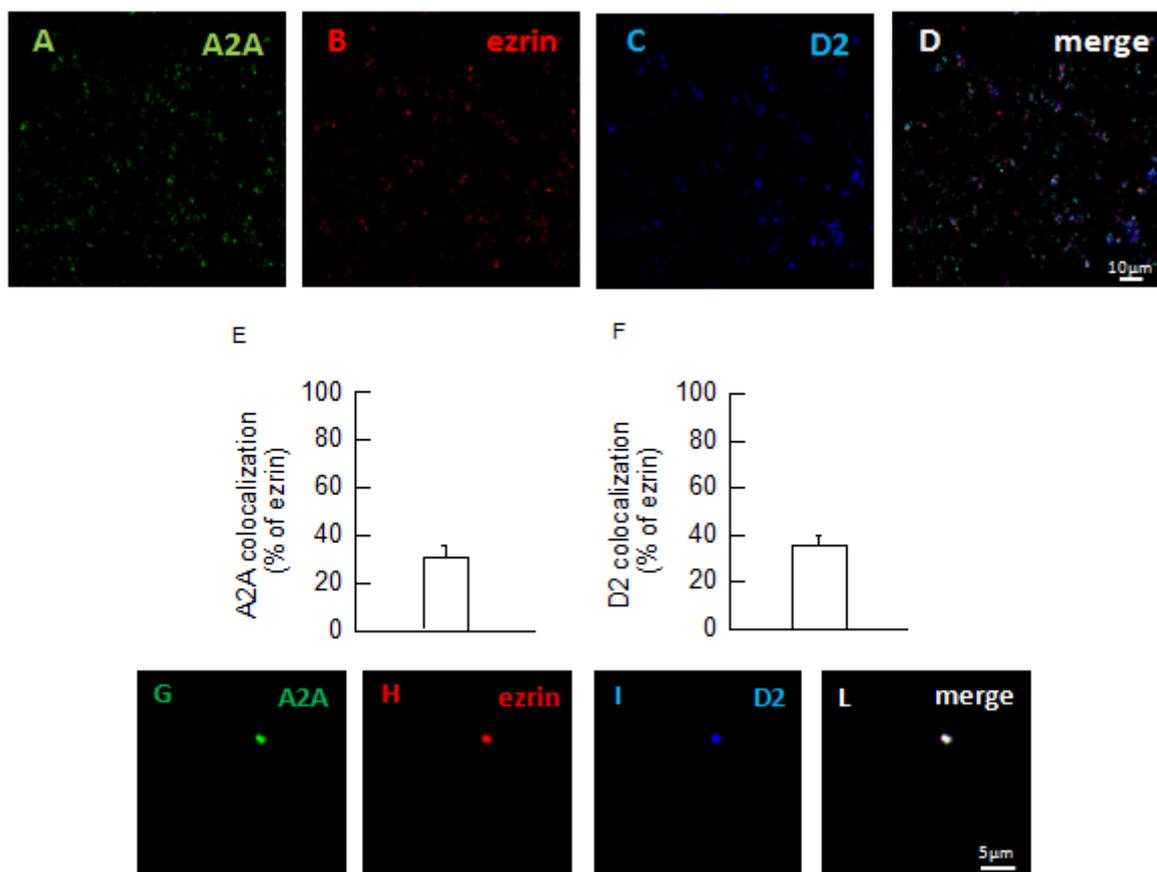
Sono state condotte ulteriori analisi di immunofluorescenza utilizzando i marker specifici per i processi astrocitari, GFAP ed ezrin. L'analisi della co-espressione di A2A e D2 con il marker GFAP ha dimostrato che, nelle nostre condizioni sperimentali, questi recettori erano espressi su circa il 40% dei processi astrocitari GFAP+ (**figura 3**). Le immagini dei singoli processi positivi per A2A, GFAP e D2 sono mostrati ad alto ingrandimento in **figure 3G-L** mentre le loro relative popolazioni sono riportati in **3A-D**.



**FIGURA 3.** Co-localizzazione dei recettori A2A e D2 in processi astrocitari striatali GFAP+: risultati ottenuti mediante analisi di microscopia confocale.

*Analisi di co-localizzazione dei recettori A2A e D2 con il marker astrocitario GFAP: la co-espressione dei marker è mostrata nel pannello D mentre i grafici (E-F) sono rappresentativi della percentuale pari al 40% di recettori A2A (E) e D2 (F) co-espressi sui processi astrocitari GFAP+. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 3-6 campi ottenuti da cinque diversi esperimenti. Le immagini di un singolo processo positivo per GFAP, A2A e D2 sono riportati nei pannelli G-L. Le scale bars misurano 5  $\mu$ m o 10  $\mu$ m a seconda dell'immagine presa in esame. Immagine modificata da Cervetto et al., 2018.*

L'analisi della co-espressione di A2A e D2 con il marker ezrin ha dimostrato che, nelle nostre condizioni sperimentali, questi recettori erano espressi su circa il 35% dei processi positivi per ezrin, marker selettivo dei processi astrocitari presinaptici (**figura 4**). Le immagini di singoli processi positivi per ezrin, A2A e D2 sono mostrati ad alto ingrandimento in **figura 4G-L**.



**FIGURA 4. Co-localizzazione dei recettori A2A e D2 in processi astrocitari striatali ezrin+: risultati ottenuti mediante analisi di microscopia confocale.**

*Analisi di co-localizzazione dei recettori A2A (A) e D2 (C) con il marker astrocitario ezrin (B): la co-espressione dei marker è mostrata in D mentre i grafici (E-F) sono rappresentativi della percentuale pari al 40%, di recettori A2A (E) e D2 (F) espressi sui processi astrocitari ezrin+. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 3-6 campi ottenuti da cinque diversi esperimenti.*

*Le immagini di un singolo processo positivo per A2A, ezrin e D2 sono riportati nei pannelli G-L.*

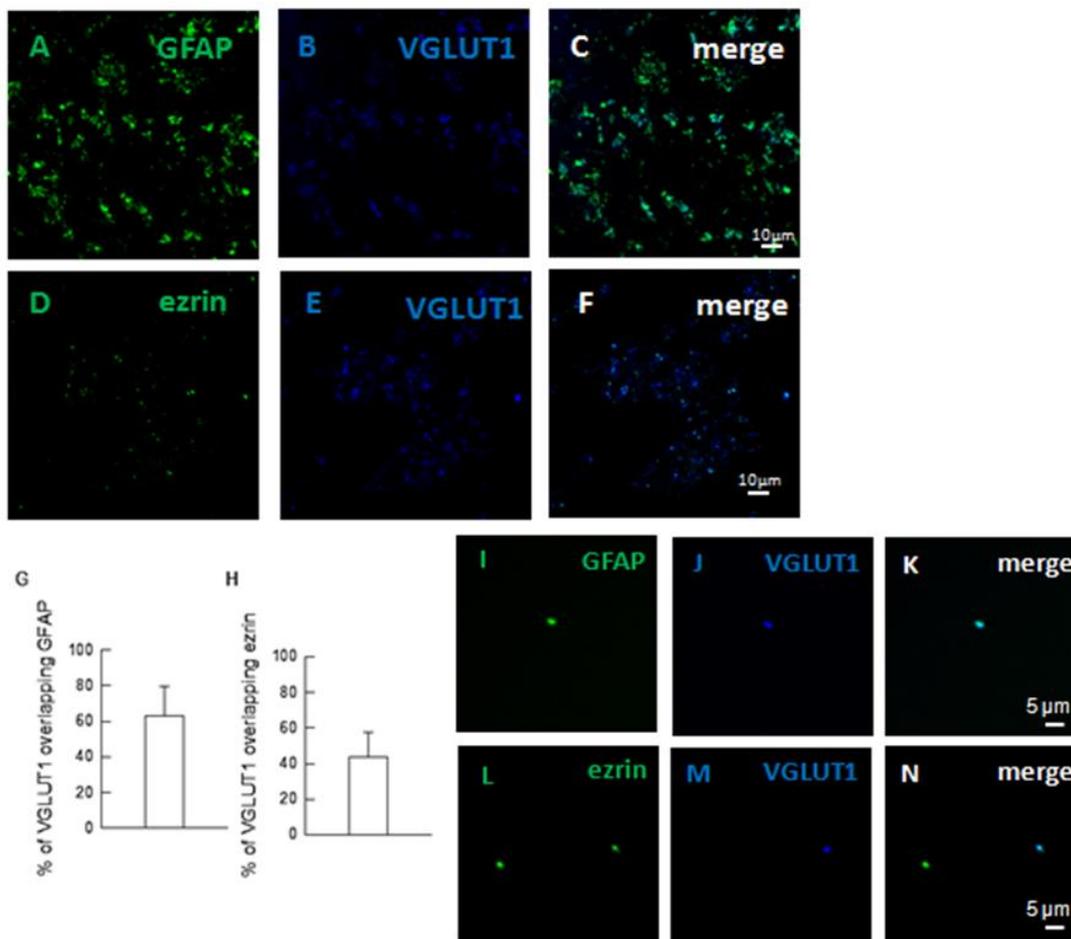
*Le scale bars misurano 5  $\mu$ m o 10  $\mu$ m a seconda dell'immagine presa in esame.*

*Immagine modificata da Cervetto et al., 2018.*

## 4.3 I PROCESSI ASTROCITARI POSSIEDONO TRASPORTATORI VESICOLARI DEL GLUTAMMATO

I processi astrocitari, positivi alla marcatura con GFAP o ezrin, esprimevano anche il trasportatore vescicolare del glutammato di tipo 1, VGLUT1, la cui presenza indica la natura glutammatergica delle vescicole (**figura 5**). L'analisi condotta sulle immagini ha evidenziato

che circa il 60% del VGLUT1 è presente in processi GFAP+ e oltre il 40% è espresso nei gliosomi ezrin+ (figura 5G e H).



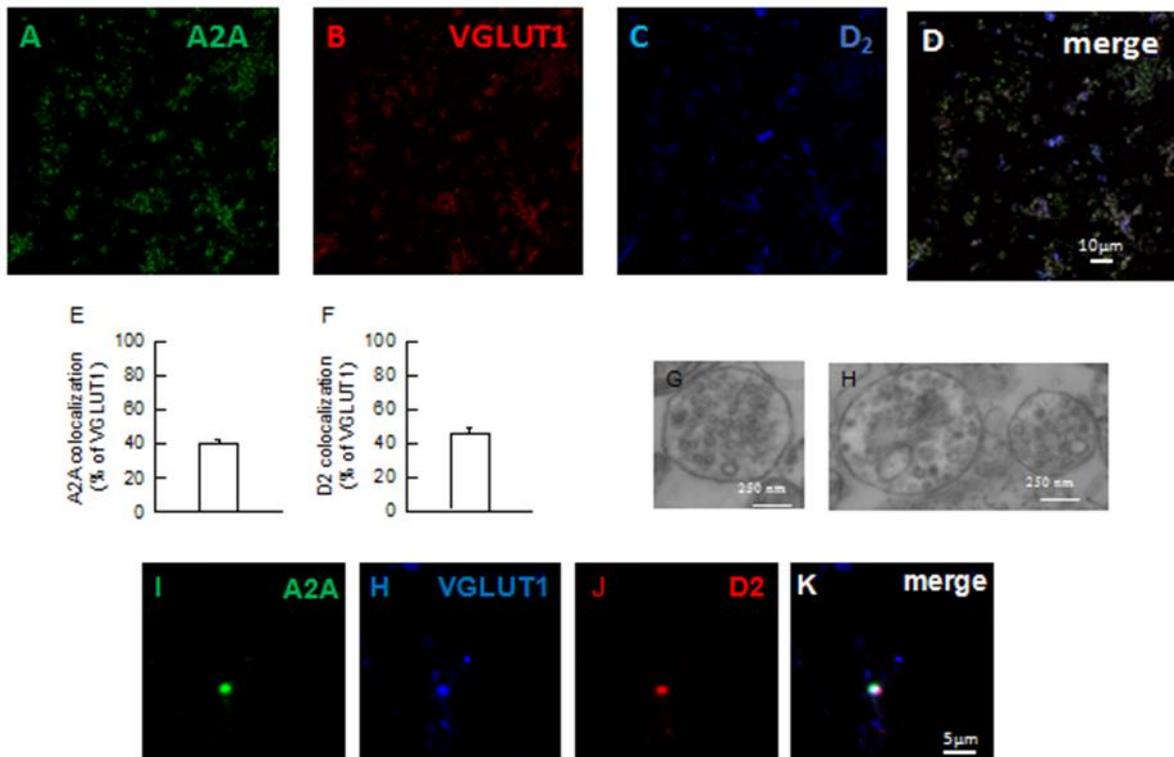
**FIGURA 5. I gliosomi striatali possiedono il trasportatore vescicolare per glutammato.**

Nei pannelli A-F sono riportate immagini esemplificative ottenute tramite l'analisi di immunofluorescenza per GFAP, ezrin e il trasportatore vescicolare per il glutammato VGLUT1, per quanto riguarda campi comprendenti numerosi processi. Le immagini I-N sono rappresentative di singoli processi. L'immunofluorescenza di GFAP ed ezrin è rispettivamente riportata in A e D, quella di VGLUT1 in B ed E. Le co-localizzazioni GFAP-VGLUT1 ed ezrin VGLUT1 sono invece mostrate in C ed F. Le scale bars misurano 5 μm o 10 μm a seconda dell'immagine presa in esame.

I pannelli G-H riportano rispettivamente la percentuale della sovrapposizione del trasportatore vescicolare VGLUT1 su GFAP ed ezrin, rispettivamente pari al 60% e al 40%. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale ± SEM di 3-4 campi ottenuti da tre diversi esperimenti. Immagine modificata da Cervetto et al., 2018.

## 4.4 I RECETTORI A2A E D2 SONO ESPRESI SU PROCESSI ASTROCITARI CHE DISPONGONO DI VGLUT1

L'analisi di immunofluorescenza condotta su processi astrocitari ha potuto dimostrare che i recettori A2A e D2 erano anche co-localizzati con su gliosomi VGLUT1+ (**figura 6**). L'analisi condotta sulle immagini ha evidenziato che circa il 40% dei processi che esprimono VGLUT1 presentavano anche i recettori A2A e oltre il 40% dei recettori D2 (**figura 6E-F**).



**FIGURA 6.** Le immagini mostrano la co-localizzazione di A2A e D2 con VGLUT1 nei processi astrocitari striatali.

Immagini esemplificative ottenute tramite l'analisi di immunofluorescenza per A2A, D2 e il marcatore VGLUT1 sono riportate nei pannelli A-D. I pannelli E-F sono rappresentativi della percentuale pari al 40% di recettori A2A (E) e D2 (F) espressi in processi positivi per il trasportatore vescicolare VGLUT1. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 3-4 campi ottenuti da tre diversi esperimenti.

I pannelli G-H riportano le immagini ottenute dall'analisi con microscopia elettronica, nelle quali viene confermata la presenza di vescicole nei processi astrocitari di striato. In particolare, è caratteristica la diffusa distribuzione citoplasmatica di vescicole aventi un diametro di circa 30 nm e sia nude sia rivestite da clatrina in processi astrocitari preparati da tessuto fresco prelevato da animale adulto. L'immunofluorescenza di VGLUT1 in un singolo processo è invece riportata nell'immagine J, mentre nei pannelli I-L sono riportate le immagini dei processi positivi per A2A e D2. La sovrapposizione dei tre canali è mostrata in L.

Le scale bars misurano 5  $\mu$ m, 10  $\mu$ m o 250 nm a seconda dell'immagine presa in esame. Immagine modificata da Cervetto et al., 2018.

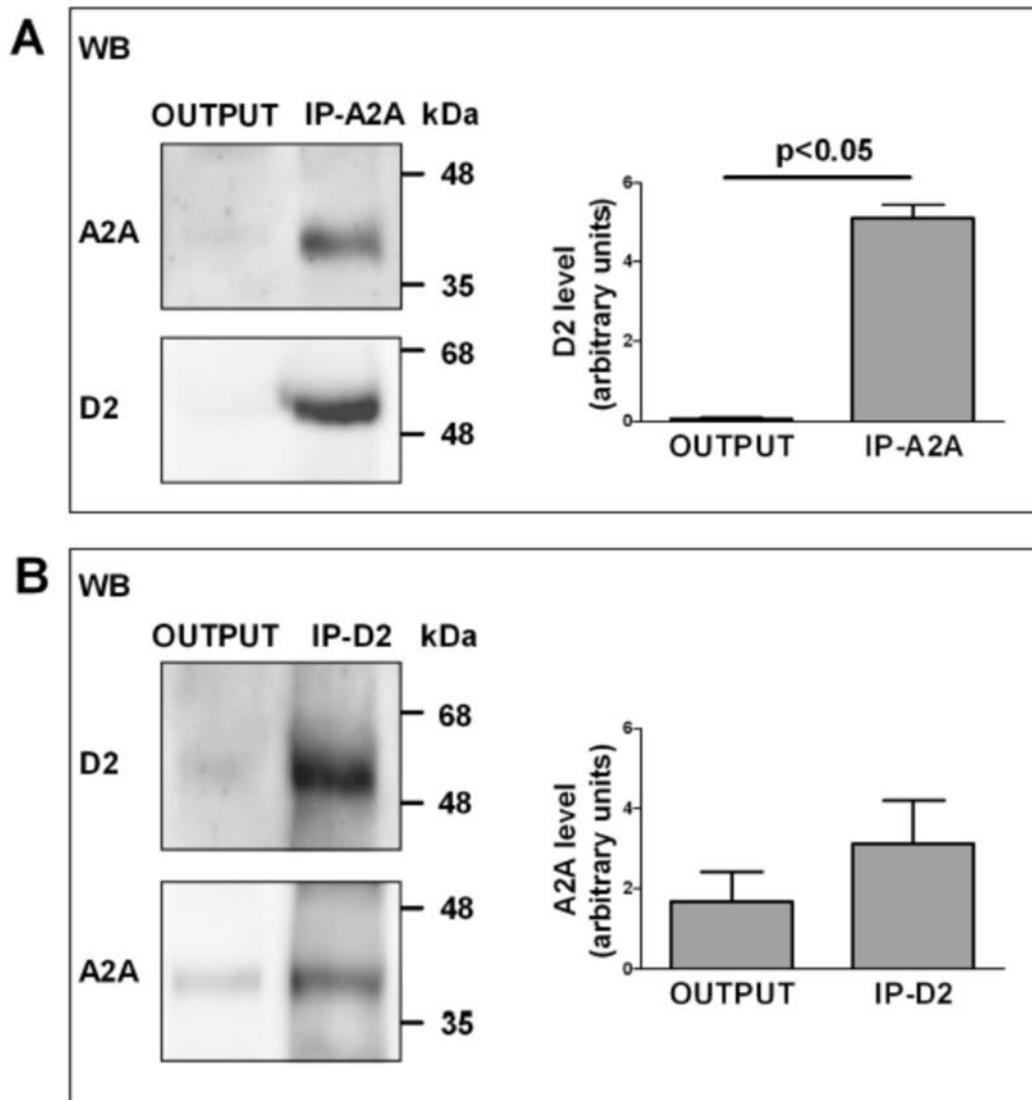
Questo dato evidenzia che i recettori si trovavano co-espressi su processi astrocitari contenenti vescicole adibite al rilascio del trasmettitore glutammato. La presenza di vescicole nei processi astrocitari di striato è stata confermata da analisi con microscopia elettronica: le **figure 6 G-H** mostra infatti i processi astrocitari in cui è caratteristica una diffusa distribuzione citoplasmatica di vescicole aventi un diametro di circa 30 nm e sia nude sia rivestite da clatrina.

I dati qui riportati indicano che nello striato di ratto adulto sono espressi recettori A2A per l'adenosina e D2 per la dopamina; in particolare, questi recettori sono co-espressi sulle strutture astrocitarie (GFAP o ezrin positive) insieme a VGLUT1, spiegando il controllo del rilascio di glutammato mediato da D2 e l'interazione recettoriale A2A – D2 sulla liberazione del gliotrasmettitore (Cervetto et al., 2017 e 2018). Infatti, mentre l'attivazione dei recettori D2 causava una riduzione del rilascio di glutammato, l'attivazione del recettore A2A, di per sé inefficace nel modulare il rilascio del gliotrasmettitore, contrastava l'effetto dell'attivazione del recettore dopaminergico (Cervetto et al., 2017 e 2018).

## 4.5 I RECETTORI A2A E D2 INTERAGISCONO FISICAMENTE: CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

La capacità dei recettori A2A e D2 di interagire fisicamente sugli astrociti striatali è stata dimostrata con studi di co-immunoprecipitazione. L'analisi è stata condotta su membrane isolate dai gliosomi preparati da striato di ratto adulto come indicato nel capitolo Materiali e Metodi. Il protocollo di immunoprecipitazione prevedeva di ottenere due campioni, l'OUTPUT o sovranatante e l'IP o immunoprecipitato, entrambi successivamente analizzati con tecnica Western blot. In particolare dall'analisi del materiale immunoprecipitato con anticorpo anti-A2A e del corrispondente OUTPUT (**figura 7A**) si è dimostrata l'efficacia della precipitazione ed è stato evidenziato che il recettore D2 immunoprecipitava totalmente con il recettore A2A, non potendo osservare alcuna banda immunoreattiva nell'OUTPUT corrispondente.

Dall'analisi del materiale immunoprecipitato con anticorpo anti-D2 e del corrispondente OUTPUT (**figura 7B**) si è dimostrata l'efficacia della precipitazione ed è stato evidenziato che il recettore A2A immunoprecipitava con il recettore D2, osservando solo una lieve banda immunoreattiva nell'OUTPUT corrispondente.



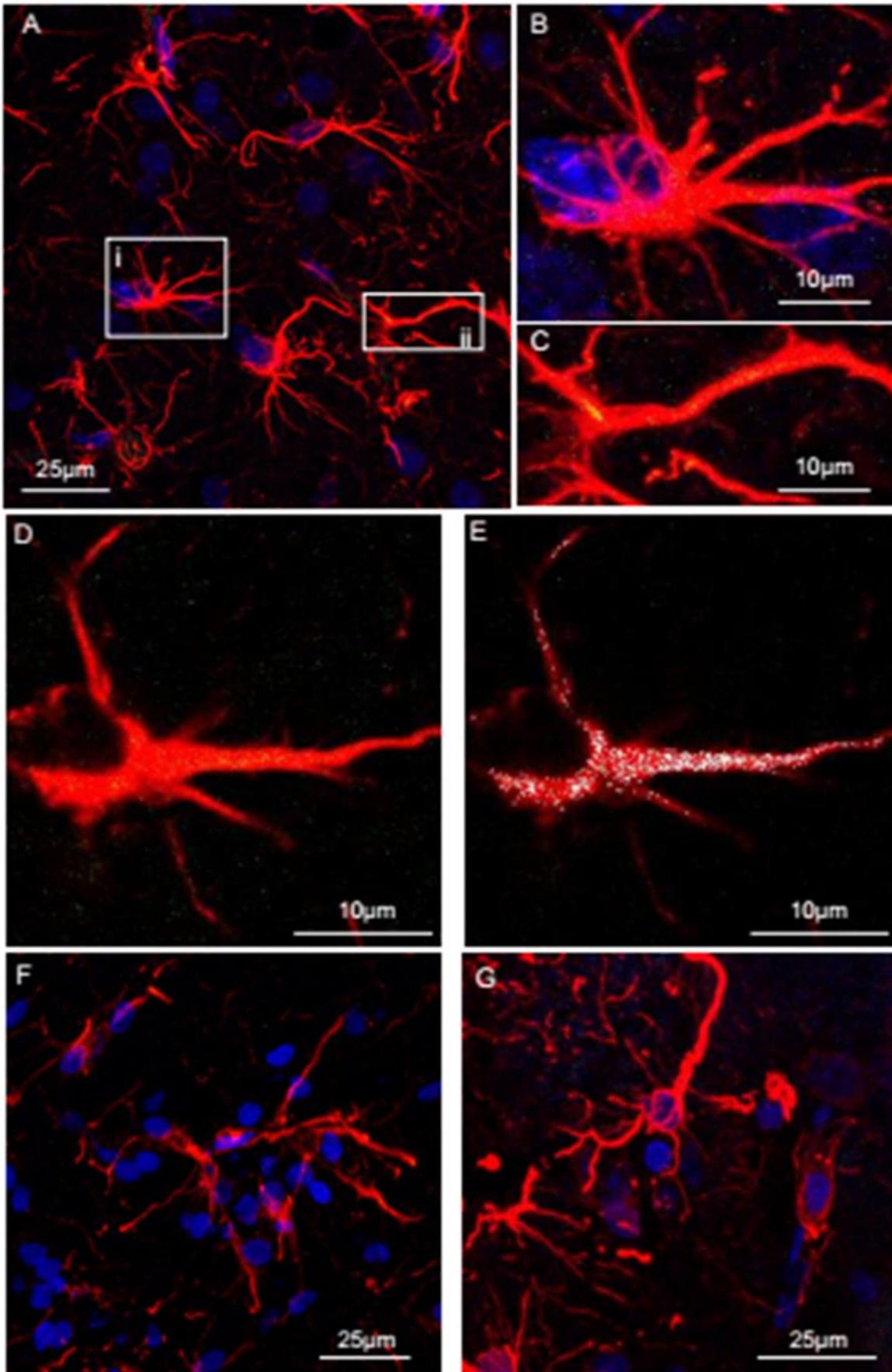
**FIGURA 7. Interazione tra i recettori A2A e D2 sui processi astrocitari striatali: co-immunoprecipitazione.**

Lo studio delle interazioni tra i recettori A2A e D2 su processi astrocitari di ratto è stato eseguito tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione. In particolare, sono state prelevate aliquote (300  $\mu$ g) di un materiale proteico solubilizzato con Triton X-100, ottenuto dalle membrane dei gliosomi. Si è quindi usato 1  $\mu$ g di anticorpo anti-A2A (**A**) o anti-D2 (**B**) come descritto in Materiali e Metodi. Il materiale immunoprecipitato (IP) e non immunoprecipitato (OUTPUT) è stato analizzando con tecnica di immunoblotting utilizzando anticorpi anti-A2A e anti-D2. La quantità di D2 immunoprecipitato con A2A forma una banda (**A**) che è stata convertita in valore numerico e riportata nel grafico a lato. Analogamente, la quantità di A2A immunoprecipitato con D2 forma una banda (**B**) che è stata convertita in valore numerico e riportata nel grafico a lato. I dati sono stati espressi come il valore medio percentuale  $\pm$  SEM di 3 campi derivanti da tre esperimenti indipendenti. Immagine tratta da Pelassa et al., 2019.

Questo dato indica che i recettori D2 espressi sui processi astrocitari striatali erano completamente associati ai recettori A2A mentre i recettori A2A erano anche espressi non associati ai recettori D2.

## 4.6 I RECETTORI A2A E D2 INTERAGISCONO FISICAMENTE: PLA

I dati fin qui raccolti non erano però sufficienti per poter affermare che negli astrociti striatali i recettori A2A e D2 formano eteromeri. Infatti, sia il dato funzionale ottenuto sul rilascio di glutammato (Cervetto et al., 2017), sia quello di co-localizzazione in astrociti e gliosomi (Cervetto et al., 2018) ed infine la co-immunoprecipitazione in membrane gliosomiali, appena descritta, indicavano una interazione funzionale tra i recettori e la loro presenza in un complesso molecolare. Come descritto nel capitolo Introduzione, per poter affermare l'esistenza di eteromeri è necessaria anche una evidenza fisica della stretta vicinanza delle proteine recettoriali. A tal scopo sono stati condotti esperimenti di PLA in fettine striatali e, come mostrato in **figura 8**, è stato possibile identificare eteromeri A2A-D2 in cellule GFAP+. La tecnica PLA, diversamente dalla semplice immunofluorescenza (**figura 1C**), permette di vedere solo i complessi eteromerici, cioè lo spot luminoso, in verde in **figura 8**, si ottiene solo se i due recettori sono distanti tra loro meno di 40 nm. L'analisi prevedeva di realizzare diversi controlli negativi, ottenuti esponendo le fettine a solo uno dei due anticorpi primari, (**figura 8 F e G**), rispettivamente omettendo l'anticorpo anti-A2A e anti-D2.



**Figura 8. Eterodimeri A2A-D2 negli astrociti striatali.**

*Per l'analisi PLA in fettine striatali sono stati utilizzati tre diversi anticorpi primari: policlonale di coniglio anti-A2A, monoclonale di topo anti-D2 e policlonale di capra anti-GFAP. L'immagine **A** è la proiezione di massima intensità di un campo (240x240  $\mu\text{m}$ ; z 10  $\mu\text{m}$ ) rappresentativo di quanto ottenuto: GFAP è rappresentato in rosso, DAPI (colorante nucleare) in blu, la PLA per i complessi recettoriali A2A-D2 appare in verde. Gli spot PLA co-localizzati su strutture GFAP+ appaiono in giallo. In **B** è riportato l'ingrandimento della regione **Ai**. In **C** è riportata la sovrapposizione di GFAP e PLA della regione **Aii** ingrandita. In **D** è riportata la sovrapposizione di GFAP e PLA di un singolo piano focale z della regione **Aii** ingrandita, mentre in **E** è rappresentata la mappa di colocalizzazione dello stesso piano z riportato in **D**: l'immagine è stata ottenuta utilizzando il colocalization analysis plugins-colocalization threshold del software ImageJ Fiji, impostando GFAP come regione d'interesse o ROI. In **E** ed **F** sono riportate due immagini rappresentative dei controlli negativi ottenuti omettendo rispettivamente l'anticorpo primari anti-A2A e anti-D2.*

*Le scale bars sono di 25  $\mu\text{m}$  o 10  $\mu\text{m}$  come indicato nelle immagini.*

*Figura in parte tratta da Pelassa et al., 2019.*

Tutti questi dati supportano l'esistenza degli eterodimeri A2A e D2 negli astrociti striatali di ratto adulto.

# 5. DISCUSSIONE

I dati riportati in questa tesi sono stati recentemente pubblicati (Pelassa et al. 2019) e hanno contribuito ad ottenere prove fisiche e biochimiche che soddisfano completamente il criterio 1 sui recettori eteromerici A2A-D2 in astrociti nativi adulti dello striato (vedi capitoli introduzione). Questo criterio, già trattato nel capitolo introduzione, enuncia che i componenti degli eteromeri devono co-localizzare e interagire fisicamente direttamente o attraverso proteine agendo come modulatori allosterici.

Per comprendere al meglio l'importanza dei dati di questa tesi, che hanno il fine di provare negli astrociti striatali nativi l'esistenza di un'interazione recettoriale tra A2A e D2 che sembra quindi basata su un fenomeno di eteromerizzazione recettoriale, è necessario integrarli con quelli ottenuti da studi funzionali svoltisi in precedenza e recentemente pubblicati (Cervetto et al. 2018 e 2017). Altri lavori dimostrarono l'eteromerizzazione di A2A e D2 usando vari modelli di indagine, come cellule trasfettate (Hillion et al. 2002; Agnati et al. 2003; Canals et al. 2003; Kamiya et al. 2003; Fuxe et al. 2005; Vidi et al. 2008; Borroto-Escuela et al. 2010; Guidolin et al. 2015; Gomes et al. 2016) o membrane e neuroni striatali da cui si sono state ottenute prove funzionali e fisiche (Hillion et al. 2002; Agnati et al. 2003, Fuxe et al. 2005; Azdad et al. 2009; Cabello et al. 2009; Trifilieff et al. 2011; Borroto-Escuela et al. 2013; Navarro et al. 2014; Gomes et al. 2016).

Per riassumere i principali risultati ottenuti sono:

- 1) la dimostrazione della co-espressione dei recettori A2A e D2 su processi astrocitari purificati da striato di ratto adulto, riflettendo quindi il comportamento dei processi astrocitari in network neurone-astrocita maturati in loco (analisi di immunofluorescenza e microscopia confocale)
- 2) la dimostrazione della interazione fisica tra recettori A2A e D2 in astrociti maturati in loco (PLA con analisi di immunofluorescenza per marcatore di compatimento cellulare e microscopia confocale)
- 3) la dimostrazione dell'esistenza di un complesso molecolare in cui sono presenti i recettori A2A e D2 su membrane di processi astrocitari purificati da striato di ratto adulto (co-

immunoprecipitazione e analisi western blot).

I risultati qui illustrati vanno però discussi insieme a quelli ottenuti sulle prove funzionali dell'esistenza di un eteromero A2A-D2 ottenute sempre su processi astrocitari purificati preparati a partire da striato di ratto adulto:

- 1) evidenze della loro interazione funzionale ottenute mediante misurazione del rilascio di gliotrasmettitore glutammato da processi astrocitari striatali purificati: il recettore D2 inibiva il rilascio del glutammato, mentre l'attivazione del recettore A2A, di per sé inefficace, aboliva l'effetto della stimolazione del recettore D2.
- 2) evidenze della loro interazione funzionale ottenute mediante l'interferenza nell'eteromerizzazione A2A-D2: un peptide, corrispondente alla regione recettoriale D2 coinvolta nelle interazioni con il recettore A2A, impediva al recettore A2A di svolgere la sua attività di controllo sugli effetti mediati dal D2 sul rilascio di gliotrasmettitore glutammato da processi astrocitari striatali purificati.
- 3) evidenze della loro interazione funzionale nel controllo del rilascio del gliotrasmettitore glutammato da processi astrocitari striatali purificati: i due recettori formano eteromeri mediante interazione allosterica recettore-recettore a livello astrocitario.

I recettori nativi A2A e D2 sono co-espressi in processi striatali GFAP ed ezrin positivi e in particolare nella sottopopolazione VGLUT1 positiva: i recettori possono quindi potenzialmente interagire tra loro fisicamente e funzionalmente nel controllo del rilascio del gliotrasmettitore glutammato. Infatti, l'attivazione del recettore D2 riduceva il rilascio di glutammato evocato da stimolo depolarizzante, mentre l'attivazione del recettore A2A, di per sé inefficace sul rilascio di glutammato, conteneva il controllo mediato dal D2 (Cervetto et al. 2017). Il peptide sintetico VLRRRRKRVN, corrispondente alla regione del recettore D2 coinvolta nell'interazione elettrostatica necessaria per l'eteromerizzazione A2A-D2 (Ciruela, F et al., 2004), annullava l'effetto mediato dall'attivazione dell'A2A (Cervetto et al 2017) suggerendo proprio che l'interazione elettrostatica tra il terzo loop intracellulare del D2 e la coda intracellulare del recettore A2A è necessaria per l'interazione recettoriale anche negli astrociti nativi. L'omocisteina, nota per la sua attività allosterica sull'eterodimero A2A-D2 (Guidolin, D. et al., 2019), poteva aumentare l'effetto inibitorio di A2A sul controllo dopaminergico (mediato da D2) del rilascio vescicolare di glutammato. Le evidenze farmacologiche suggerivano quindi un'eteromerizzazione recettoriale, come per altro anche il fatto che i due recettori nativi si comportassero in linea con quanto osservato sulle cellule trasfettate (Ciruela, F. et al., 2004; Agnati, L.F, et al. 2006). Tuttavia, mancava un'evidenza dell'interazione fisica e biochimica,

come richiesto dal *criterio 1*, che solo una combinazione di altre tecniche poteva fornire (Franco, R. et al., 2016). L'evidenza fisica è stata ottenuta dalla co-immunoprecipitazione e poi confermata dalla PLA condotta in situ, su astrociti presenti in fettine di striato. La tecnica PLA ha permesso di ottenere una risposta più certa sulla co-espressione di protomeri e della reale possibilità di una loro interazione fisica: si riesce ad ottenere un segnale solo quando i due protomeri sono disposti ad una distanza inferiore a 16 nm. Solo così, infatti, riesce a generarsi il costrutto a cui si lega un solo anticorpo secondario coniugato con sonda fluorescente e quindi fornendo un dato consistente con l'eteromerizzazione. L'analisi condotta al microscopio confocale, in particolare con tecnica PLA, ha permesso di dimostrare che i recettori A2A e D2 sono entrambi espressi sui processi astrocitari ad una distanza tra loro inferiore ai 16 nm e quindi a distanza compatibile con l'eteromerizzazione (Trifilieff, P. et al., 2011).

La sola analisi di co-immunoprecipitazione non è di per sé sufficiente per stabilire l'abilità dei protomeri di eteromerizzare, ma è una valida indicazione di una possibile interazione fisica tra essi. Analizzando le bande immunoreattive è da notare che tutto il recettore D2 co-immunoprecipitava in associazione con A2A, mentre usando l'anticorpo per il recettore dopaminergico, una frazione di A2A restava comunque nel medium. Questa indicazione sembra quindi suggerire che, sulle membrane astrocitarie striatali, il recettore D2 è espresso in complessi molecolari in cui è presente anche A2A, diverso è invece il contrario. In neuroni striatali era stato ipotizzato che, a causa dell'elevata presenza di recettori D2, l'eteromero A2A-D2 potesse coesistere con omomeri A2A-A2A (Canals, M. et al. 2004.) Allo stesso modo questo potrebbe essere ipotizzato anche nei processi astrocitari. Sarebbe interessante eseguire lo stesso tipo di analisi anche sui terminali nervosi e ciò potrebbe aiutare nella comprensione della trasmissione glutammatergica nella sinapsi striatale, in cui sia neuroni sia astrociti hanno un loro ruolo fondamentale; inoltre questo tipo di approfondimento servirebbe anche per comprendere meglio il controllo mediato da parte dei neurotrasmettitori adenosina e dopamina.

Il risultato dell'analisi di co-immunoprecipitazione è inoltre perfettamente in linea con i dati funzionali precedentemente osservati (Cervetto et al. 2017): l'attivazione di A2A annullava completamente l'inibizione mediata da D2 sul rilascio di glutammato da processi astrocitari; un meccanismo simile di regolazione era stato indicato anche nei neuroni striatali (Trifilieff, P. et al.; 2011).

La tecnica PLA è oggi considerata particolarmente importante per dimostrare l'esistenza di eterodimeri in cellule (Gomes, I. et al. 2016; Trifilieff, P. et al. 2011;).

La presenza di un segnale PLA (in verde) in cellule GFAP positive è quindi una prova forte dell'esistenza di eterodimeri A2A-D2 sulle membrane plasmatiche di astrociti striatali, confermando nuovamente i dati funzionali ottenuti da semplice analisi d'immunofluorescenza e da co-immunoprecipitazione.

I risultati riportati sono stati oggetto di pubblicazione e rappresentano la prima prova dell'esistenza di eteromeri capaci di modulare la trasmissione di gliotrasmettitore. L'eteromerizzazione di GPCRs nativi in astrociti è scarsamente studiata e in letteratura sono disponibili pochi lavori a riguardo. Sono riportate solo l'eteromerizzazione di recettori cannabinoidi CB2 con i recettori GPR55 in astrociti della corteccia prefrontale di individui suicidi (García-Gutiérrez, M.S. et al. 2018), l'eteromerizzazione di recettori del gusto T1R2 e T1R3 (Shin, Y.J. et al. 2010) e quella tra il recettore per la serotonina 5-HT1A e il D2 in astrociti e neuroni sempre nella corteccia prefrontale (Kolasa, M. et al. 2018)

In futuro sarà necessario definire meglio gli aspetti che diversificano gli eteromeri A2A-D2 in astrociti e neuroni striatali, per esempio cercando di analizzare in maniera approfondita i diversi tipi di astrociti e considerando che nei neuroni l'attivazione di A2A induce un rilascio di neurotrasmettitore glutammato (Cervetto et al. 2017).

L'eteromerizzazione A2A-D2 suggerisce comunque nuove linee di ricerca relative a quella patologia in cui è stata già dimostrata una disregolazione della trasmissione glutammatergica striatale, quali per esempio la patologia di Parkinson (PD) o i disordini neuropsichiatrici (es. schizofrenia) per individuare nuove strategie terapeutiche. Ad esempio, in modelli di PD, a livello delle sinapsi glutammatergiche si è potuto osservare un'espansione dei processi astrocitari presinaptici. È stato suggerito che nella patofisiologia del PD possa essere determinante un'interazione neuroni-astrociti alterata, correlata ad un aumento di livelli di glutammato nello striato (Villalba, R.M. et al. 2015; Chassain, C. et al. 2016).

Inoltre anche una disfunzione degli astrociti e un'alterata comunicazione intercellulare tra astrociti e neuroni a livello delle sinapsi striatali sembrano avere un ruolo importante nella determinazione del PD (Booth, H.D.E. 2017). Infatti, l'inibizione mediata da A2A del segnale dopaminergico potrebbe determinare un aumento della liberazione di glutammato (Cervetto et al., 2017,2018) e quindi gli eteromeri astrocitari A2A-D2 potrebbero rappresentare un nuovo target farmacologico per molecole bivalenti (allo stesso tempo antagoniste su A2A e agoniste su D2) (Soriano, A. et al. 2009), per controllare la trasmissione glutammatergica nel PD. In questa patologia sono stati trovati over espressione di recettori A2A (Sperlágh, B. et al., 2011;

Villar-Menéndez, et al., 2014), stretta co-localizzazione di recettori A2A con ectonucleotidasi (Augusto, E. et al.2013), che producono adenosina a partire da ATP extracellulare, e aumentata espansione dei processi presinaptici: tutti questi aspetti fanno pensare che quindi un antagonismo selettivo di recettori A2A astrocitari potrebbe effettivamente avere un impatto significativo sulla trasmissione glutammatergica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- AbdAlla, S. et al.; Involvement of the amino terminus of the B (2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 26079–26084.
- Agnati L.F., Ferré S., Lluís C., Franco R. and Fuxe K.; Molecular mechanisms and therapeutical implications of intramembrane receptor/receptor interactions among heptahelical receptors with examples from the striatopallidal GABA neurons; *Pharmacol. Rev.* 2003; 55, 509-550.
- Agnati, L.F., Ferré, S., Genedani, S., Leo, G., Guidolin, D., Filafarro, M., Carriba, P., Casado, V., Lluís, C., Franco, R., et al.; Allosteric modulation of dopamine D2 receptors by homocysteine. *J. Proteome Res.* 2006b; 5, 3077–3083.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Benfenati, F., Battistini, N., Harfstrand, A., Hökfelt, T., Cavicchioli, L., Tatemoto, K., and Mutt, V. Failure of neuropeptide Y in vitro to increase the number of  $\alpha$ 2-adrenergic binding sites in membranes of medulla oblongata of the spontaneous hypertensive rat. *Acta Physiol. Scand.* 1983b; 119, 309–312.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Giardino, L., Calza, L., Zoli, M., Battistini, N., Benfenati, F., Vanderhaeghen, J.J., Guidolin, D., Ruggeri, M. Evidence for cholecystinin-dopamine receptor interactions in the central nervous system of the adult and old rat. Studies on their functional meaning. *Ann. NY Acad. Sci.* 1985; 448, 315–333.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Zini, I., Lenzi, P., and Hökfelt T. Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med.Biol.* 1980; 58, 182–187.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Zoli, M., Rondanini, C., and Ogren, S.O. New vistas on synaptic plasticity: the receptor mosaic hypothesis on the engram. *Med. Biol.* 1982; 60, 183–190.
- Agnati, L.F., Guidolin, D., Leo, G., Carone, C., Genedani, S., and Fuxe, K. Receptor-receptor interactions: a novel concept in brain integration. *Progr. Neurobiol.* 2010 a; 90, 157–175.

- Agnati, L.F., Leo, G., Zanardi, A., Genedani, S., Rivera, A., Fuxe, K., and Guidolin, D. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. *Acta Physiol.* 2006 a; 187, 329–344.
- Albizu L, Holloway T, Gonzalez-Maeso J, Sealton SC. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Neuropharmacology.* 2011; 61:770–77.
- Angers, S. et al. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42, 409–4357.
- Angers, S., Salahpour, A., and Bouvier, M. Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mam-malian cells. *Life Sci.* 2001; 68, 2243–2250.
- Augusto E., Matos M., Sévigny J., El-Tayeb A., Bynoe M.S., Müller C.E., Cunha R.A. and Chen J.F. “Ecto-5’-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A<sub>2A</sub> receptor functions. *J Neurosci* 2013; 33, 11390-11399.
- Ayoub M, Zhang Y, Kelly R, See H, Johnstone E, et al. Functional interaction between angiotensin II receptor type 1 and chemokine (C-C motif) receptor 2 with implications for chronic kidney disease. *PLOS ONE.* 2015; 10: e0119803.
- Ayoub, M.A. et al. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *Biol. Chem.* 2002; 277, 21522–2152821.
- Azdad K., Gall D., Woods A.S., Ledent C., Ferré S. Schiffmann S.N. Dopamine D<sub>2</sub> and adenosine A<sub>2A</sub> receptors regulate NMDA-mediated excitation in accumbens neurons through A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> receptor heteromerization. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34, 972-986.
- Bal A., Bachelot T., Savasta M., Manier M., Verna J.M., Benabid A.L. and Feuerstein C. Evidence for dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1994; 23, 204-212.

- Banères JL, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: evidence for a novel pentameric assembly between the dimeric leukotriene B4 receptor BLT1 and the G-protein. *J Mol Biol.* 2003; 329:815–829.
- Bellot M, Galandrin S, Boularan C, Matthies HJ, Despas F, et al. Dual agonist occupancy of AT1-R- $\alpha$ 2C-AR heterodimers results in atypical Gs-PKA signaling. *Nat Chem Biol.* 2015; 11:271–79.
- Berggard T, Linse S, James P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics.* 2007; 7:2833–42.
- Bernstein H.-G., Steiner J., Guest P.C., Dobrowolny H. and Bogerts B. (2015) Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. *Schizophr. Res.* 2015; 161, 4-18.
- Bockaert, J. and Pin, J.P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 1999; 18, 1723–1729.
- Bofill-Cardona E, Kudlacek O, Yang Q, Ahorn H, Freissmuth M, Nanoff C. Binding of calmodulin to the D2-dopamine receptor reduces receptor signaling by arresting the G protein activation switch. *J Biol Chem.* 2000; 275:32672–32680.
- Boison D., Singer P., Shen H.Y., Feldon J., Yee B.K. Adenosine hypothesis of schizophrenia - opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology.* 2012; 62, 1527-1543.
- Bonaventura J, Rico AJ, Moreno E, Sierra S, Sánchez M, et al. L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A2A adenosine–CB1 cannabinoid–D2 dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus. *Neuropharmacology.* 2014; 79:90–100.
- Booth, H.D.E.; Hirst, W.D.; Wade-Martins, R. The role of astrocyte dysfunction in Parkinson’s disease pathogenesis. *Trends Neurosci.* 2017, 40, 358–370.
- Borroto-Escuela D, Tarakanov A, Guidolin D, Ciruela F, Agnati LF, Fuxe K. Moonlighting characteristics of G protein-coupled receptors: focus on receptor heteromers and relevance for neurodegeneration. *IUBMB Life.* 2011 Jul; 63(7):463-72.
- Borroto-Escuela D.O., Romero-Fernandez W., Tarakanov A.O., Gomez-Soler M., Corrales F., Marcellino D., Narvaez M., Frankowska M., Flajolet M., Heintz N., Agnati L.F., Ciruela

- F. and Fuxe K. Characterization of the A2AR-D2R interface: focus on the role of the C-terminal tail and the transmembrane helices. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2010; 402, 801-807.
- Borroto-Escuela, D.O., Flajolet, M., Agnati, L.F., Greengard, P., and Fuxe, K. Bioluminescence resonance energy transfer methods to study G protein-coupled receptor-receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods Cell Biol.* 2013 a; 117, 141–164.
  - Borroto-Escuela, D.O., Romero-Fernandez, W., Garriga, P., Ciruela, F., Narvaez, M., Tarakanov, A.O., Palkovits, M., Agnati, L.F., and Fuxe, K. G protein-coupled receptor heterodimerization in the brain. *Methods Enzymol.* 2013b; 521, 281–294.
  - Bouvier, M. and Hébert, T.E. CrossTalk opposing view: weighing the evidence for class A GPCR dimers, the jury is still out. *J. Physiol.* 2014; 592, 2443–2445.
  - Bulenger S, Marullo S, Bouvier M. Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26:131–37.
  - Bushlin I, Gupta A, Stockton SD, Jr, Miller LK, Devi LA. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates  $\delta$  opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLOS ONE.* 2012; 7: e49789.
  - Cabello N., Gandía J., Bertarelli D.C., Watanabe M., Lluís C., Franco R., Ferré S., Luján R. and Ciruela F. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J. Neurochem.* 2009; 109, 1497-507.
  - Callén L, Moreno E, Barroso-Chinea P, Moreno-Delgado D, Cortés A, et al. Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol. Chem.* 2012; 287:20851–65.
  - Canals, M.; Burgueno, J.; Marcellino, D.; Cabello, N.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Agnati, L.; Ferre, S.; Bouvier, M.; Fuxe, K.; et al. Homodimerization of adenosine A2A receptors: Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Neurochem.* 2004, 88, 726–734.

- 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. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 46741-46749.
- Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32:2249–59.
- Catts V.S., Wong J., Fillman S.G., Fung S.J. and Weickert C.S. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: association with neuroinflammation. *Aust. N. Z. J. Psychiatry,* 2014; 48, 722-734.
- Cervetto C., Venturini A., Passalacqua M., Guidolin D., Genedani S., Fuxe K., Borroto-Esqueda D., Cortelli P., Woods A., Maura G., Marcoli M., Agnati L. A2A-D2 receptor–receptor interaction modulates gliotransmitter release from striatal astrocyte processes. *Neurochemistry.* 2017; 140: 268-279.
- Cervetto C., Vergani L., Passalacqua M., Ragazzoni M., Venturini A., Cecconi F., Berretta N., Mercuri N., D’Amelio M., Maura G., Mariottini P., Voci A., Marcoli M. and Cervelli M. Astrocyte-dependent vulnerability to excitotoxicity in spermine oxidase overexpressing mouse. *Neuromolecular Med.* 2016;2018; 18, 50-68.
- Chabot JG, Kar S, Quirion R. Autoradiographical and immunohistochemical analysis of receptor localization in the central nervous system. *Histochem J.* 1996; 28:729–45.
- Charles AC, Mostovskaya N, Asas K, Evans CJ, Dankovich ML, Hales TG. Coexpression of  $\delta$ -opioid receptors with  $\mu$  receptors in GH3 cells changes the functional response to mu agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol.* 2003; 63:89–95.
- Chassain, C.; Melon, C.; Salin, P.; Vitale, F.; Couraud, S.; Durif, F.; Kerkerian-Le G, L.; Gubellini, P. Metabolic, synaptic and behavioral impact of 5-week chronic deep brain stimulation in hemiparkinsonian rats. *J. Neurochem.* 2016; 136, 1004–1016.
- Chilmonczyk, Z., Bojarski, A.J., and Sylte, I. Ligand-directed trafficking of receptor stimulus. *Pharmacol. Rep.* 66,2014; 1011–1021.

- Chow BS, Kocan M, Bosnyak S, Sarwar M, Wigg B, et al. Relaxin requires the angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 2014; 86:75–85.
- Christopoulos, A. and Kenakin, TG protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* 2002; 54, 323–374.
- Ciruela F, Burgueno J, Casado V, Canals M, Marcelino D, Goldberg SR, Bader M, Fuxe K, Agnati LF, Lluís C, Franco R, Ferré S, Woods AS. Combining Mass spectrometry and pull-down techniques for the study of receptor heteromerization. Direct epitope-epitope electrostatic interactions between adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *Anal Chem.* 2004; 76:5354–63.
- Ciruela F, Escriche M, Burgueno J, Angulo E, Casado V, Soloviev MM, Canela EI, Mallol J, Chan WY, Lluís C, McIlhinney RA, Franco R. Metabotropic glutamate 1 $\alpha$  and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *J Biol Chem* 2001; 276:18345–51.
- Daniels DJ, Lenard NR, Etienne CL, Law PY, Roerig SC, Portoghese PS. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *PNAS.* 2005; 102:19208–13.
- Dasgupta S, Ferré S, Kull B, Hendlund P, Finnman U-B, Ahlberg S, Arenas E, Fredholm BB, Fuxe K. Adenosine A2A receptors modulate the binding characteristics of dopamine D2 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *Eur J Pharmacol.* 1996; 316:325–31.
- Dean, M.K., Higgs, C., Smith, R.E., Bywater, R.P., Snell, C.R., Scott, P.D., Upton, G.J., Howe, T.J., and Reynolds, C.A. Dimerization of G-protein-coupled receptors. *J. Med. Chem.* 2001; 44, 4595–4614.
- Decaillet FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits  $\beta$ -arrest in to enhance cell migration. *J Biol Chem.* 2011; 286:32188–97.
- Decaillet FM, Rozenfeld R, Gupta A, Devi LA. Cell surface targeting of  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heterodimers by RTP4. *PNAS.* 2008; 105:16045–50.

- Díaz-Cabiale Z, Hurd Y, Guidolin D, Finnman U-B, Zoli M, Vanderhaeghen J-J, Fuxe K, Ferré Adenosine A2A agonist CGS 21680 decreases the affinity of dopamine D2 receptors for dopamine in human striatum. *NeuroReport* 2001; 12:1831–4.
- Dixon AK, Widdowson L, Richardson PJ. Desensitisation of the adenosine A1 receptor by the A2A receptor in the rat striatum. *J Neurochem.* 1997; 69:315–21.
- Eidne, K.A. et al. Applications of novel resonance energy transfer techniques to study dynamic hormone receptor interactions in living cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 2002; 13, 415–4218.
- Fan T, Varghese G, Nguyen T, Tse R, O’Dowd BF, George SR. A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor hetero oligomers. *J Biol Chem.* 2005; 280:38478–88.
- Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluís C, Woods AS, Fuxe K, Franco R. Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in ‘local modules’: The striatal spine module. *Brain Res Rev.* 2007 a; 55:55–67.
- Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 2009; 5:131–34.
- Ferré S, Borycz J, Goldberg SR, Hope BT, Morales M, Lluís C, Franco R, Ciruela F, Cunha R. Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses. *J Integr Neurosci.* 2005; 4:445–64.
- Ferré S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci* 2007c; 30:440–6.
- Ferré S, Fredholm BB, Morelli M, Popoli P, Fuxe K. Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1997; 20:482–7.
- Ferré S, Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB. Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience* 1992; 51:501–12.
- Ferré S, Herrera-Marschitz M, Grabowska-Andén M, Ungerstedt U, Casas M, Andén N-E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit a D2-mediated behaviour in short-term reserpinized mice. *Eur J Pharmacol* 1991b; 192:30–5.

- Ferré S, Herrera-Marschitz M, Grabowska-Andén M, Ungerstedt U, Casas M, Andén N-E. Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: II. Postsynaptic dopamine agonism and adenosine antagonism of methylxanthines in short-term reserpinized mice. *Eur J Pharmacol* 1991c; 192:36–42.
- Ferré S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueno J, Gutierrez MA, Casado V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluis C, Franco R, Ciruela F. Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:11940–5.
- Ferré S, O'Connor WT, Fuxe K, Ungerstedt U. The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J Neuroscience* 1993; 13:5402–6.
- Ferré S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K. Antagonistic interaction between adenosine A2a and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience* 1994; 63:765–73.
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. Stimulation of high affinity adenosine A-2 receptors decreases the affinity of dopamine D-2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991a; 88:7238–41.
- Fink JS, Weaver DR, Rivkees SA, Peterfreund RA, Pollack AE, et al. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992; 14:186–95
- Franco R, Casado V, Cortes A, Ferrada C, Mallol J, Woods A, Lluis C, Canela EI, Ferré S. Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heteromerization. *The Scientific World JOURNAL* 2007; 7:48–57.
- Franco, R., Ferré, S., Agnati, L.F., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, Casado, V., Lledo, P.M., Zoli, M., Lluis, C., et al. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23, S50–S59.
- Franco, R; Martínez-Pinilla, E.; Lanciego, J.L.; Navarro, G. Basic Pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Front. Pharmacol*. 2016; 7, 76.

- Frederick AL, Yano H, Trifilieff P, Vishwasrao HD, Biezonski D, et al. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. *Mol Psychiatry*. 2015; 20:1373–85.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53:527–52.
- Fuxe K, Borroto-Escuela D, Ciruela F, Guidolin D, Agnati L). Receptor-receptor interactions in heteroreceptor complexes: a new principle in biology. Focus on their role in learning and memory. *Neurosci Discov*. 2014 a; 2:6.
- Fuxe K., Borroto-Escuela D.O., Tarakanov A.O., Romero-Fernandez W., Ferraro L., Tanganelli S., Perez-Alea M., Di Palma M. and Agnati L.F. Dopamine D2 heteroreceptor complexes and their receptor-receptor interactions in ventral striatum: novel targets for antipsychotic drugs *Prog. Brain Res*. 2014b; 211, 113-139.
- Fuxe K., Ferré S., Canals M., Torvinen M., Terasmaa A., Marcellino D., Goldberg S.R., Staines W., Jacobsen K.X., Lluís C., Woods A.S., Agnati L.F. and Franco R. Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function. *J. Mol. Neurosci*. 2005; 26, 209-220.
- Fuxe K., Guidolin D., Agnati L.F. and Borroto-Escuela D.O. Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2015b; 19, 377-398.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Benfenati, F., Celani, M., Zini, I., Zoli, M., and Mutt, V. Evidence for the existence of receptor-receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. *Neural. Transm*. 1983a; 18, 165–179.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Harfstrand, A., Janson, A.M., Neumeyer, A., Andersson, K., Ruggeri, M., Zoli, M., and Goldstein, M. Morpho functional studies on the neuropeptide Y/adrenaline costoring terminal systems in the dorsal cardiovascular region of the medulla oblongata. Focus on receptor-receptor interactions in cotransmission. *Prog. Brain Res*. 1986; 68, 303–320.
- Fuxe, K., Agnati, L.F., Harfstrand, A., Martire, M., Goldstein, M., Grimaldi, R., Bernardi, P., Zini, I., Tatamoto, K., and Mutt, V. Evidence for a modulation by neuropeptide Y of the

$\alpha$ -2 adrenergic transmission line in central adrenaline synapses. New possibilities for treatment of hypertensive disorders. *Clin. Exp. Hypertens Part A* 6, 1984; 1951–1956

- Fuxe, K., Agnati, L.F., Harfstrand, A., Zini, I., Tatemoto, K., Pich, E.M., Hökfelt, T., Mutt, V., and Terenius, L. Central administration of neuropeptide Y induces hypotension bradypnea and EEG synchronization in the rat. *Acta Physiol. Scand.* 1983b; 118, 189–192
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D.O., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., Filip, M., Ferraro, L., Woods, A.S., Tarakanov, A., et al. GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19, 356–363.
- Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M., and Agnati, L.F. Integrated events in central dopamine transmission as analysed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1998; 26, 258–273.
- Galandrin S1, Oligny-Longpré G, Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Aug; 28(8):423-30.
- García-Gutiérrez, M.S.; Navarrete, F.; Navarro, G.; Reyes-Resina, I.; Franco, R.; Lanciego, J.L.; Giner, S.; Manzanares, J. Alterations in Gene and Protein Expression of Cannabinoid CB2 and GPR55 Receptors in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Suicide Victims. *Neurotherapeutics* 2018, 15, 796–806.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, et al. Oligomerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem.* 2000; 275:26128–35.
- George, S.R. et al. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1, 808–820
- Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, Rondin S, Lew JY, Watson S, Zoli M, Agnati LF, Verniera P, Lluís C, Ferré S, Fuxe K, Franco R. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; 97:8606–11.

- Gomes I, Fujita W, Chandrakala MV, Devi LA. Disease-specific heteromerization of G-protein-coupled receptors that target drugs of abuse. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013a; 117:207–65.
- Gomes I., Ayoub M.A., Fujita W., Jaeger W.C., Pflieger K.D. and Devi L.A. G Protein-coupled receptor heteromers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2016; 56, 403-425.
- Gomes I, Gupta A, Devi LA. G-protein-coupled heteromers: regulation in disease. *Methods Enzymol.* 2013b; 521:219–38.
- Gomes, I.; Sierra, S.; Devi, L.A. Detection of Receptor Heteromerization Using in Situ Proximity Ligation Assay. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2016; 75, 2.16.1–2.16.31.
- Gonzalez S, Moreno-Delgado D, Moreno E, Perez-Capote K, Franco R, et al. Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D4 receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. *PLOS Biol.* 2012; 10: e1001347.
- González S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, et al. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry.* 2012; 17:650–62.
- Guidolin D., Agnati L.F., Marcoli M., Borroto-Escuela D.O. and Fuxe K. G-protein-coupled receptor type A heteromers as an emerging therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2015; 19, 265-283.
- Guidolin D.; Marcoli, M.; Tortorella, C.; Maura, G.; Agnati, L.F. Receptor-receptor interactions as a widespread phenomenon: Novel targets for drug development? *Front. Endocrinol.* 2019; 10, 53
- Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, et al. Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal.* 2010; 3:ra54.
- Hakansson K, Galdi S, Hendrick J, Snyder G, Greengard P, Fisone G. Regulation of phosphorylation of the GluR1 AMPA receptor by dopamine D2 receptors. *J Neurochem* 2006; 96:482–8.
- Hammad MM, Dupré DJ. Chaperones contribute to G protein-coupled receptor oligomerization, but do not participate in assembly of the G protein with the receptor signaling complex. *J Mol Signal.* 2010; 5:16.

- Hansen JL, Hansen JT, Speerschneider T, Lyngso C, Erikstrup N, et al. Lack of evidence for AT1R/B2R heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 cells: How common is the AT1R/B2R heterodimer? *J Biol Chem.* 2009; 284:1831–39.
- Hasbi A, Nguyen T, Fan T, Cheng R, Rashid A, et al. Trafficking of preassembled opioid  $\mu$ - $\delta$  heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. *Biochemistry.* 2007; 46:12997–3009.
- He SQ, Zhang ZN, Guan JS, Liu HR, Zhao B, et al. Facilitation of  $\mu$ -opioid receptor activity by preventing  $\delta$ -opioid receptor-mediated codegradation. *Neuron.* 2011; 69:120–31.
- Hebert TE, Gales C, Rebois RV. Detecting and imaging protein-protein interactions during G protein-mediated signal transduction in vivo and in situ by using fluorescence-based techniques. *Cell Biochem Biophys.* 2006; 45:85–109.
- Hebert, T.E. et al. A peptide derived from a beta2-adrenergicreceptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerizationand activation. *J. Biol. Chem.* 1996; 271, 16384–16392
- Hernanz-Falcon, P. et al. (2004) Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat. Immunol.* 5,216–223.
- Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE. Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2c</sub> receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem.* 2005; 280:40144–40151.
- Hillion J., Canals M., Torvinen M., Casado V., Scott R., Terasmaa A., Hansson A., Watson S., Olah M.E., Mallol J., Canela E.I., Zoli M., Agnati L.F., Ibanez C.F., Lluís C., Franco R., Ferre S. and Fuxe K. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A<sub>2A</sub> receptors and dopamine D<sub>2</sub> receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 18091-18097.
- Horvat, R.D. et al. Binding of agonist but not antagonist leads to fluorescence resonance energy transfer between intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* 2001; 15, 695–703
- Issafras, H. et al. Constitutive agonist-independent CCR5oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 34666–34673.

- Jaeger WC, Armstrong SP, Hill SJ, Pflieger KDG. Biophysical detection of diversity and bias in GPCR function. *Front Endocrinol.*; 2014; 5:26.
- Jordan BA, Devi LA. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature.* 1999; 399:697–700.
- Kabli N, Fan T, O’Dowd BF, George SR.  $\mu$ - $\delta$  Opioid receptor heteromers-specific signaling in the striatum and hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450:906–11.
- Kabli N, Nguyen T, Balboni G, O’Dowd BF, George SR. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects following activation of the  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heteromer in the nucleus accumbens. *Mol Psychiatry.* 2014; 19:986–94.
- Kachroo A, Orlando LR, Grandy DK, Chen JF, Young AB, Schwarzschild MA. Interactions between metabotropic glutamate 5 and adenosine A2A receptors in normal and parkinsonian mice. *J Neurosci* 2005; 25:10414–19.
- Kaczor AA, Selent J. Oligomerization of G protein–coupled receptors: biochemical and biophysical methods. *Curr Med Chem.* 2011; 18:4606–34.
- Kamiya T., Saitoh O., Yoshioka K. and Nakata H. Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306; 544-549.
- Kenakin, T. Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42, 349–379.
- Kenakin, T. and Miller, L.J). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62, 265–304.
- Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG. Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron.* 2012; 73:317–32.
- Kniazeff, J. et al. Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat. Struct.Mol. Biol.* 2004; 11, 706–713.

- Kocan M, Pflieger KDG. Study of GPCR-protein interactions by BRET. *Methods Mol Biol.* 2011; 746:357–71.
- Kolasa, M.; Solich, J.; Faron-Górecka, A.; Zurawek, D.; Pabian, P.; Łukasiewicz, S.; Kuśmider, M.; Sazafran-Pilch, K.; Szlachta, M.; Dziedzicka-Wasylewski, M. Paroxetine and Low-dose Risperidone Induce Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and Dopamine D<sub>2</sub> Receptor Heteromerization in the Mouse Prefrontal Cortex. *Neuroscience* 2018; 377, 184–196.
- Koos B, Andersson L, Clausson CM, Grannas K, Klaesson A, et al. Analysis of protein interactions in situ by proximity ligation assays. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014; 377:111–26.
- Kudlacek O, Just H, Korkhov VM, Vartian N, Klinger M, Pankevych H, Yang Q, Nanoff C, Freissmuth M, Boehm S. The human D<sub>2</sub> dopamine receptor synergizes with the A<sub>2A</sub> adenosinereceptor to stimulate adenylyl cyclase in PC12 cells. *Neuropsychopharmacology*, 2003; 28:1317–27.
- Kull B, Ferré S, Arslan G, Svenningsson P, Fuxe K, Owman C, Fredholm BB. Reciprocal interactions between adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in CHO cells co-transfected with the two receptors. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58:1035–45.
- Kunishima, N. et al. Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature.* 2000; 407, 971–977.
- Kurumaji A. and Toru M. (1998) An increase in [<sup>3</sup>H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res.* 1998; 808, 320–323.
- Law PY, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, et al. Heterodimerization of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem.* 2005; 280:11152–64.
- Le Naour M, Akgün E, Yekkirala A, Lunzer MM, Powers MD, et al. Bivalent ligands that target  $\mu$  opioid (MOP) and cannabinoid1 (CB1) receptors are potent analgesics devoid of tolerance. *J Med Chem.* 2013; 56:5505–13.
- Lefkowitz, R.J. and Shenoy S.K. Transduction of receptor signals by  $\beta$ -arrestins. *Science.* 2005; 308, 512–517.

- Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, et al. Blocking the protease-activated receptor 1–4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation*. 2006; 113:1244–54.
- Lenard NR, Daniels DJ, Portoghese PS, Roerig SC. Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing  $\mu$ -opioid receptor agonist and  $\delta$ -opioid receptor antagonist pharmacophores. *Eur J Pharmacol*. 2007; 566:75–82.
- Levsky JM, Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*. 2003; 116:2833–38.
- Liang Y, Fotiadis D, Filipek S, Saperstein DA, Palczewski K, Engel A. Organization of the Gprotein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *J Biol Chem* 2003; 278:21655–21662.
- Lin H, Trejo J. Transactivation of the PAR1–PAR2 heterodimer by thrombin elicits  $\beta$ -arrestin-mediated endosomal signaling. *J Biol Chem*. 2013; 288:11203–15.
- Liu XY, Liu ZC, Sun YG, Ross M, Kim S, et al. Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids. *Cell*. 2011; 147:447–58.
- Liu Y, Buck DC, Macey TA, Lan H, Neve KA. Evidence that calmodulin binding to the dopamine D2 receptor enhances receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res* 2007; 27:47–65.
- Marshall, F.H. et al. GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol. Sci*. 1999; 20, 396–399.
- Matos M., Augusto E., Agostinho P., Cunha R.A. and Chen J.F. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase- $\alpha$ 2 controlling glutamate uptake in astrocytes. *J. Neurosci*. 2013; 33, 18492-18502.
- Matos M., Shen H.-Y., Augusto E., Wang Y., Wei C.J., Wang Y.T., Agostinho P., Boison D., Cunha R.A. and Chen J.-F. (2015) Deletion of adenosine A2A receptors from astrocytes disrupts glutamate homeostasis leading to psychomotor and cognitive impairment: relevance to schizophrenia. *Biol. Psy*. 2015; 78, 763-774.

- McGraw DW, Mihlbachler KA, Schwarb MR, Rahman FF, Sma KM, et al. Airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate  $\beta$ 2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J Clin Investig.* 2006; 116:1400–9.
- Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, Bouvier M. Quantitative assessment of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem.* 2002; 277:44925–31.
- Milan-Lobo L, Whistler JL. Heteromerization of the  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors produces ligand-biased antagonism and alters  $\mu$ -receptor trafficking. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 337:868–75.
- Milligan G, Bouvier M. Methods to monitor the quaternary structure of G protein–coupled receptors. *FEBS J.* 2005; 272:2914–25
- Mitterauer B.J. (Pathophysiology of schizophrenia based on impaired glial-neuronal interactions. *Open J. Med. Psychol.* 2014; 3, 42110.
- Miyazaki I, Asanuma M., Diaz-Corrales F.J., Miyoshi K. and Ogawa N. Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.* 2004; 1029, 120-123.
- **Moreno JL, Holloway T, Gonzalez-Maeso J. G protein–coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Trans Sci.* 2013; 117:187–205.**
- Moreno JL, Muguruza C, Umali A, Mortillo S, Holloway T, et al. Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT2A · mGlu2) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J Biol Chem.* 2012; 287:44301–19.
- Mustafa S, See HB, Seeber RM, Armstrong SP, White CW, et al. Identification and profiling of novel  $\alpha$ 1A-adrenoceptor-CXC chemokine receptor 2 heteromer. *J Biol Chem.* 2012; 287:12952–65.

- Navarro G., Aguinaga D., Moreno E., Hradsky J., Reddy P.P., Cortés A., Mallol., Casadó V., Mikhaylova M., Kreutz M.R., Lluís C., Canela E.I., McCormick P.J. and Ferré S. Intracellular calcium levels determine differential modulation of allosteric interactions within G protein-coupled receptor heteromers. *Chem. Biol.* 2014; 21, 1546-1556.
- Overton, M.C. and Blumer, K.J. G protein coupled receptors function as oligomers in vivo. *Curr. Biol.* 2000; 10, 341–344.
- Overton, M.C. et al. Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoporphin A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 2003; 278, 49369–49377.
- Pelassa S, Guidolin D, Venturini A, Averna M, Giulia Frumento, Campanini L, Rosa Bernardi, Cortelli P, Calandra Buonauro G, Guido M, Luigi F. Agnati, Cervetto C. and Marcoli M. A2A-D2 Heteromers on Striatal Astrocytes: Biochemical and Biophysical Evidence. 2018.
- Pello OM, Martinez-Muñoz L, Parrillas V, Serrano A, Rodríguez-Frade JM, et al. Ligand stabilization of CXCR4/ $\delta$ -opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol.* 2008; 38:537–49.
- Perea G., Navarrete M. and Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009; 32, 421-431.
- Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Laugsch M, Holtt V, Schulz S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem.* 2002; 277:19762–72.
- Pfleger KDG, Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) *Nat Methods.* 2006; 3:165–74.
- Pin JP, Neubig R, Bouvier M, Devi L, Filizola M, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev.* 2007; 59:5–13.
- Popoli P, Pezzola A, Torvinen M, Reggio R, Pintor A, Scarchili L, Fuxe K, Ferré S. The selective mGlu5 receptor agonist CHPG inhibits quinpirole-induced turning in 6-hydroxydopamine-lesioned rats and modulates the binding characteristics of dopamine D2

receptors in the rat striatum: Interactions with adenosine A2A receptors. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25:505–13.

- Portoghese, P.S. From models to molecules: opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptor probes. *J. Med. Chem.* 2001; 44, 2259–2269.
- Ray, K. et al. Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2C) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2C) receptor. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 27642–27650
- Rial D., Lara D.R. and Cunha R.A. The adenosine neuromodulation system in schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 2014; 119, 395-449.
- Rimondini R, Ferré S, Giménez-Llort L, Ögren SO, Fuxe K. Differential effects of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on dopamine receptor agonist-induced behavioural responses in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998; 347:153–8.
- Rios C, Gomes I, Devi LA.  $\mu$  Opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuriteogenesis. *Br J Pharmacol.* 2006; 148:387–95.
- Rocheville, M. et al. Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* 2000; 275,7862–7869.
- Rodriguez-Frade, J.M. et al. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999; 96,3628–3633
- Rozenfeld R, Bushlin I, Gomes I, Tzavaras N, Gupta A, et al. Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLOS ONE.* 2012; 7: e29239.
- Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling:  $\beta$ -arrestin2-mediated ERK activation by  $\mu$ - $\delta$  opioid receptor heterodimers. *FASEB J.* 2007; 21:2455–65.
- Rozenfeld R, Gupta A, Gagnidze K, Lim MP, Gomes I, et al. AT1R-CB1R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *EMBO J.* 2011; 30:2350–63.

- Salahpour, A. et al. Homodimerization of the  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J. Biol.Chem.* 2004; 279, 33390–33397.
- Salim H, Ferré S, Dalal A, Peterfreund RA, Fuxe K, Vincent JD, Lledo P-M. Activation of adenosine A1 and A2A receptors modulates dopamine D2 receptor-induced responses in stably co transfected human neuroblastoma cells. *J Neurochem.*2000; 74:432–9.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha R, Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal gangliophysiology. *Prog Neurobiol.* 2007; 83:277–92.
- Shao W., Zhang S.Z., Tang M., Zhang X.H., Zhou Z., Yin Y.Q., Zhou Q.B., Huang Y.Y., Liu Y.J., Wawrousek E., Chen T., Li S.B., Xu M., Zhou J.N., Hu G. and Zhou J.W. Suppression of neuroinflammation by astrocytic dopamine D2 receptors via alphaB-crystallin. *Nature.* 2013; 494, 90-94.
- Shin, Y.J.; Park, J.H.; Choi, J.S.; Chun, M.H.; Moon, Y.W.; Lee, M.Y. Enhanced Expression of the Sweet Taste Receptors and Alpha-gustducin in Reactive Astrocytes of the Rat Hippocampus Following Ischemic Injury. *Neurochem. Res.* 2010; 35, 1628–1634.
- Sohy D, Yano H, de Nadai P, Urizar E, Guillabert A, et al. Hetero - oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of “selective” antagonists. *J Biol Chem.* 2009; 284:31270–79.
- Soriano A., Ventura R., Molero A., Hoen R., Casadó V., Cortés A., Fanelli F., Albericio F., Lluís C., Franco R. and Royo M Adenosine A2A receptor-antagonist/dopamine D2 receptor-agonist bivalent ligands as pharmacological tools to detect A2A-D2 receptor heteromers. *J. Med Chem.*2009; 52, 5590-5602.
- Sperlágh B. and Vizi E.S. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and basal ganglia: Pharmacological and clinical aspects. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011; 11, 1034-1046.
- Stromberg I, Popoli P, Müller CE, Ferré S, Fuxe K. Electrophysiological and behavioural evidence for an antagonistic modulatory role of adenosine A2A receptors in dopamine D2 receptor regulation in the rat dopamine-denervated striatum. *Eur J Neurosci.* 2000; 12:4033–7.

- Svenningsson P, Lindskog M, Ledent C, Parmentier M, Greengard P, Fredholm BB, Fisone G. Regulation of the phosphorylation of the dopamine- and cAMP- regulated phosphoprotein of 32kDa in vivo by dopamine D1, dopamine D2, and adenosine A2A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:1856–60.
- Terrillon S, Barberis C, Bouvier M. Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with  $\beta$ -arrest in and their trafficking patterns. *PNAS*. 2004; 101:1548–53.
- Terrillon, S. et al. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol. Endocrinol*. 2003; 17, 677–691
- Torvinen M, Torri C, Tombesi A, Marcellino D, Watson S, et al. Trafficking of adenosine A2A and dopamine D2 receptors. *J Mol Neurosci*. 2005; 25:191–200.
- Trifilieff, P., Rives, M.L., Urizar, E., Piskorowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slättman, M., Gullberg, M., and Javitch, J.A. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques*. 2011; 51, 111–118
- Vardanyan R, Kumirov VK, Nichol GS, Davis P, Liktov-Busa E, et al. Synthesis and biological evaluation of new opioid agonist and neurokinin-1 antagonist bivalent ligands. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19:6135–42.
- Vidi P.A., Chen J., Irudayaraj J.M. and Watts V.J. Adenosine A(2A) receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. *FEBS Lett*. 2008; 582, 3985-3990.
- Vila-Coro, A.J. et al. HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2000; 97,3388–3393
- Villalba, R.M.; Mathai, A.; Smith, Y. Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. *Front. Neuroanat*. 2015; 9, 117.
- Villar-Menéndez, I.; Porta, S.; Buirra, S.P.; Pereira-Veiga, T.; Díaz-Sánchez, S.; Albasanz, J.L.; Ferrer, I.; Martín, M.; Barrachina, M. Increased striatal adenosine A2A receptor levels is an early event in Parkinson's disease-related pathology and it is potentially regulated by miR-34b. *Neurobiol. Dis*. 2014; 69, 206–214.

- Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, et al. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics*. 2010; 7:401–9.
- Woods AS, Ferré S. The amazing stability of the arginine-phosphate electrostatic interaction. *JProteome Res*. 2005; 4:1397–402.
- Xie, Z., Lee, S.P., O’Dowd, B.F., and George, S.R. Serotonin 5-HT1B and 5-HT1D receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBSLett*. 1999; 456, 63–67.
- Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7617–22.
- Yu L., Shen H.Y., Coelho J.E., Araújo I.M., Huang Q.Y., Day Y.J., Rebola N., Canas P.M., Rapp E.K., Ferrara J., Taylor D., Müller C.E., Linden J., Cunha R.A. and Chen J.F. Adenosine A2A receptor antagonists exert motor and neuroprotective effects by distinct cellular mechanisms. *Ann. Neurol*. 2008; 63, 338-346.
- Yuan Y, Arnatt CK, El-Hage N, Dever SM, Jacob JC, et al. A bivalent ligand targeting the putative mu opioid receptor and chemokine receptor CCR5 heterodimers: binding affinity versus functional activities. *Med Chem Commun*. 2013; 4:847–51.
- Zeng, F. and Wess, J. Molecular aspects of muscarinic receptor dimerization. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23, S19–S31.
- Zhang, Z. et al. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *Biol. Chem*. 2001; 276, 5316–5322.

# 7. RINGRAZIAMENTI

Arrivata alla fine di questo percorso vorrei ringraziare la professoressa Chiara Cervetto che ha reso possibile lo svolgimento di questa esperienza che mi ha permesso di osservare, conoscere ma soprattutto vivere in prima persona le dinamiche legate alla gestione di un laboratorio di ricerca. Ringrazio inoltre la professoressa Manuela Marcoli che ha messo a disposizione gli spazi necessari affinché questo progetto si realizzasse e il mio relatore Ernesto Fedele, docente già incontrato nel mio corso di studi, per la sua disponibilità e puntualità in ogni occasione.

Voglio inoltre esprimere la mia profonda gratitudine al dottorando Simone Pelassa per avermi seguita durante il mio lavoro, fornendomi spesso consigli e informazioni preziose affinché acquistassi maggior sicurezza nel campo. A lui auguro un brillante futuro professionale e non solo.

