UNIVERSITAT DE BARCELONA

Heterómeros de receptores de dopamina D_1 y de histamina H_3 como potenciales dianas terapéuticas en trastornos adictivos y enfermedades neurodegenerativas

María del Mar Rodríguez Ruiz

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

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

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

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

HETERÓMEROS DE RECEPTORES DE DOPAMINA D_1 Y DE HISTAMINA H_3 COMO POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS EN TRASTORNOS ADICTIVOS Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Memoria presentada por la Licenciada en Biología
MARIA DEL MAR RODRÍGUEZ RUIZ
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

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

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Maria del Mar Rodríguez Ruiz bajo la dirección del Dr. Vicent Casadó Burillo y la Dra. Estefanía Moreno Guillén

Dr. Vicent Casadó Burillo

Dra. Estefanía Moreno Guillén

Maria del Mar Rodríguez Ruiz

Barcelona, junio de 2018

1. INTRODUCCIÓN **1**

1.1 Receptores acoplados a proteína G **3**
1.1.1 Estructura de los GPCRs 4
1.1.2 Clasificación de los GPCRs 5
1.1.3 Activación y vías de señalización de los GPCRs 6
1.1.4 Actividad constitutiva y activación por ligandos de los GPCRs 10
1.1.5 Regulación de la actividad de los GPCRs 12
1.2 Oligomerización de GPCRs **14**
1.2.1 Interfaces entre GPCRs y dominios de interacción con la proteína G 16
1.2.2 Alosterismo en GPCRs 17
1.2.3 Técnicas para identificar oligómeros de GPCRs 19
1.2.4 Relevancia funcional de la oligomerización de GPCRs 23
1.3 Sistema dopaminérgico **25**
1.3.1 La dopamina como neurotransmisor 25
1.3.2 Receptores de dopamina: estructura, clasificación y expresión diferencial. 26
1.3.3 Circuitos dopaminérgicos y su relevancia fisiológica en el SNC 30
1.3.4 Receptor D_1: mecanismos de señalización 33
1.3.5 Interacciones del receptor D_1 con otras proteínas en el SNC 36
1.4 Sistema histaminérgico **39**
1.4.1 La histamina como neurotransmisor 39
1.4.2 Receptores de histamina: estructura, clasificación y expresión diferencial. 41
1.4.3 Relevancia fisiológica y patológica del sistema histaminérgico 42
1.4.4 Isoformas del receptor H_3 45
1.4.5 Interacciones del receptor H_3 con otros GPCRs: heterómeros D_1R-H_3R 48
1.5 Sistema glutamatérgico **52**
1.5.1 El glutamato como neurotransmisor 52
1.5.2 Receptores de glutamato: estructura, clasificación y expresión diferencial. 54
1.5.3 Relevancia fisiológica del receptor NMDA 57
1.5.4 Interacción del receptor NMDA con otros receptores: heterómeros NMDAR-D_1R 63
1.6 Adicción a la cocaína **65**
1.6.1 El proceso de adicción: circuitos cerebrales implicados 65
1.6.2 Mecanismo de acción de la cocaína 68
1.6.3 Receptor sigma-1 70
1.6.4 Implicación del receptor sigma-1 y el receptor D_1 en la adicción a cocaína 73
1.7 Enfermedad de Huntington **74**
1.7.1 Etiología y síntomas 74
1.7.2 Neurodegeneración en la enfermedad de Huntington 76
1.7.3 Poblaciones neuronales afectadas en la enfermedad de Huntington 78
1.7.4 Implicación de D_1R, H_3R y NMDAR en la enfermedad de Huntington 80
1.8 Enfermedad de Alzheimer **83**
1.8.1 Etiología y síntomas 83
1.8.2 Neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer 85
1.8.3 Implicación de D_1R, H_3R y NMDAR en la enfermedad de Alzheimer 88

2. OBJETIVOS **93**

3. RESULTADOS **99**

3.1 Cocaine Disrupts Histamine H_3 Receptor Modulation of Dopamine D_1 Receptor Signaling: σ_1-D_1-H_3 Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects **105**

3.2 Modulation of Dopamine D_1 receptors via Histamine H_3 receptors represent a novel therapeutic target for Huntington's disease **121**

3.3 Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D_1, Histamine H_3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease **169**

3.4 Allosteric and functional modulation of dopamine D_1 receptors by targeting histamine H_3 receptors within the D_1-H_3 heteromer **185**

3.5 Human histamine H_3 receptor isoform bias: modulation by heteromerization with dopamine D_1 receptors **223**

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN **253**

5. CONCLUSIONES **269**

6. BIBLIOGRAFÍA **277**

7. ANEXO **321**

7.1 Targeting the dopamine D_3 receptor: an overview of drug design strategies **323**

ABREVIATURAS

α_nR	Receptor α-adrenérgico (α_1R, α_2R)
α7-nAchR	Receptor ionotrópico alfa-7 nicotínico
β_nR	Receptor β-adrenérgico (β_1R, β_2R, β_3R)
δOR	Receptor δ-opioide
μOR	Receptor μ-opioide
σ_nR	Receptor sigma (σ_1R y σ_2R)
Aβ	Péptido β-amiloide
AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADHD	Trastorno por déficit de atención e hiperactividad
AICD	Dominio intracelular de la APP
AMPAR	Receptor del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
A_nR	Receptor de adenosina (A_1R, A_{2A}R, A_{2B}R y A_3R)
APP	Proteína precursora amiloide
ATD	Dominio amino terminal
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Barrera hematoencefálica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BiFC	Complementación bimolecular fluorescente
BiLC	Complementación bimolecular luminiscente
BRET	Transferencia de energía por resonancia bioluminiscente
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CARTp	Péptido del tránscrito regulado por cocaína y anfetamina
CB_nR	Receptor cannabinoide
CDK5	Quinasa dependiente de ciclina 5
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CHO cells	Células derivadas de ovario de hámster chino
CoIP	Co-inmunoprecipitación
CPP	Preferencia de lugar condicionada
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP
CTD	Dominio carboxilo terminal
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina y cAMP, peso molecular de 32kDa
DAT	Transportador de dopamina
D_nR	Receptor de dopamina (D_1R, D_2R, D_3R, D_4R y D_5R)
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EphB2R	Receptor tirosina quinasa EphrinB
FRET	Transferencia de energía por resonancia fluorescente
GABA	Ácido γ-amino butírico
GABAn	Receptor de ácido γ-aminobutírico ($GABA_A$, $GABA_B$)
Gal_nR	Receptor de galanina
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa
GASP	Proteína de direccionamiento asociada a GPCR
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde
GLT-1	Transportador de glutamato tipo 1
GMP	Guanosina monofosfato
G_n	Subunidad de la proteína G (Gα, Gβ, Gγ)
GP (GPi, GPe)	Globo pálido (interno, externo)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Quinasa de GPCRs serina-treonina específica
GTP	Guanosina trifosfato

HD	Enfermedad de Huntington
HDC	Histidina descarboxilasa
HEK cells	Células embrionarias de riñón humano
HNMT	Histamina N-metiltransferasa
H_nR	Receptor de histamina (H_1R, H_2R, H_3R y H_4R)
htt	Proteína huntingtina
MAM	Membrana mitocondrial asociada a RE
MCI	Deterioro cognitivo leve
mhtt	Proteína huntingtina mutada
nNOS	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal
IP_3	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
JNK	Quinasa c-Jun amino terminal
KAR	Receptor del ácido kaínico
K_D	Constante del equilibrio de disociación
KO	*Knockout*
L-DOPA	Levodopa
LTD	Depresión a largo plazo
LTP	Potenciación a largo plazo
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Quinasa de MAPK
mGlu	Receptores metabotrópicos de glutamato
mhtt	Proteína huntingtina mutada
M_nR	Receptor muscarínico (M_1R, M_2R, M_3R, M_4R y M_5R)
MSN	Neuronas espinosas medianas de proyección
NAc	Núcleo accumbens
NMDAR	Receptor glutamatérgico ionotrópico de N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
p75NTR	Receptor de neurotrofina p75
PD	Enfermedad de Parkinson
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A dependiente de cAMP
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Ensayo de ligación por proximidad
PLCβ	Enzima fosfolipasa Cβ
PLD	proteína fosfolipasa D
PP2B	Calcineurina
PSD	Densidad postsináptica
RE	Retículo endoplasmático
RGS	Regulador de la señalización de proteínas G
Rluc	Enzima *Renilla reniformis* luciferasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor con actividad tirosina quinasa
SNC	Sistema nervioso central
SN (SNc, SNr)	Sustancia negra (región compacta, región reticulada)
SRET	Transferencia de energía por resonancia secuencial
TH	Tirosina hidroxilasa
TM	Dominio transmembrana
TMN	Núcleo tuberomamilar del hipotálamo
TR-FRET	FRET con resolución temporal
Trkβ	Receptor tirosina quinasa B
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
VTA	Área tegmental ventral
YFP	Proteína fluorescente amarilla

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Receptores acoplados a proteína G

Las células poseen mecanismos muy variados para lograr adaptarse al medio que las rodea y establecer comunicación con otras células, basados en la transmisión de información procedente del exterior a través de la membrana celular. La regulación de estos mecanismos resulta esencial para el mantenimiento de las funciones fisiológicas y en ellos están implicadas centenares de proteínas de diversa estructura y funcionalidad. Entre éstas se encuentran los receptores acoplados a proteína G (GPCR), proteínas que constituyen la mayor familia de receptores de membrana celular en el genoma humano. Son moléculas versátiles que, al ser activadas por una amplia variedad de estímulos, son responsables de la transducción de señales extracelulares y capaces de modular distintas vías de señalización intracelulares de manera específica (Figura 1). Los GPCRs se encuentran en prácticamente cualquier organismo eucariota incluidas las plantas (Josefsson, 1999) e incluso en organismos protistas unicelulares (King et al., 2003; Klein et al., 1988), lo que refleja el origen ancestral de estas proteínas. En el genoma humano se han descrito más de 800 genes que codifican para diferentes miembros de la familia, receptores que unen y son activados por gran variedad de estímulos incluyendo fotones, iones, moléculas odorantes, gustantes, hormonas y neurotransmisores (Fredriksson et al., 2003; Wacker et al., 2017). Sus funciones son extremadamente diversas ya que regulan múltiples procesos fisiológicos tales como funciones neurológicas, inmunológicas, cardiovasculares, endocrinas y metabólicas, poniendo de manifiesto las importantes implicaciones de dichos receptores como potenciales dianas terapéuticas. De hecho, se estima que el 34% de los fármacos comercializados en la actualidad ejercen sus efectos modulando la actividad de GPCRs, el 26% de los cuales tienen como diana el sistema nervioso central (SNC) (Hauser et al., 2017).

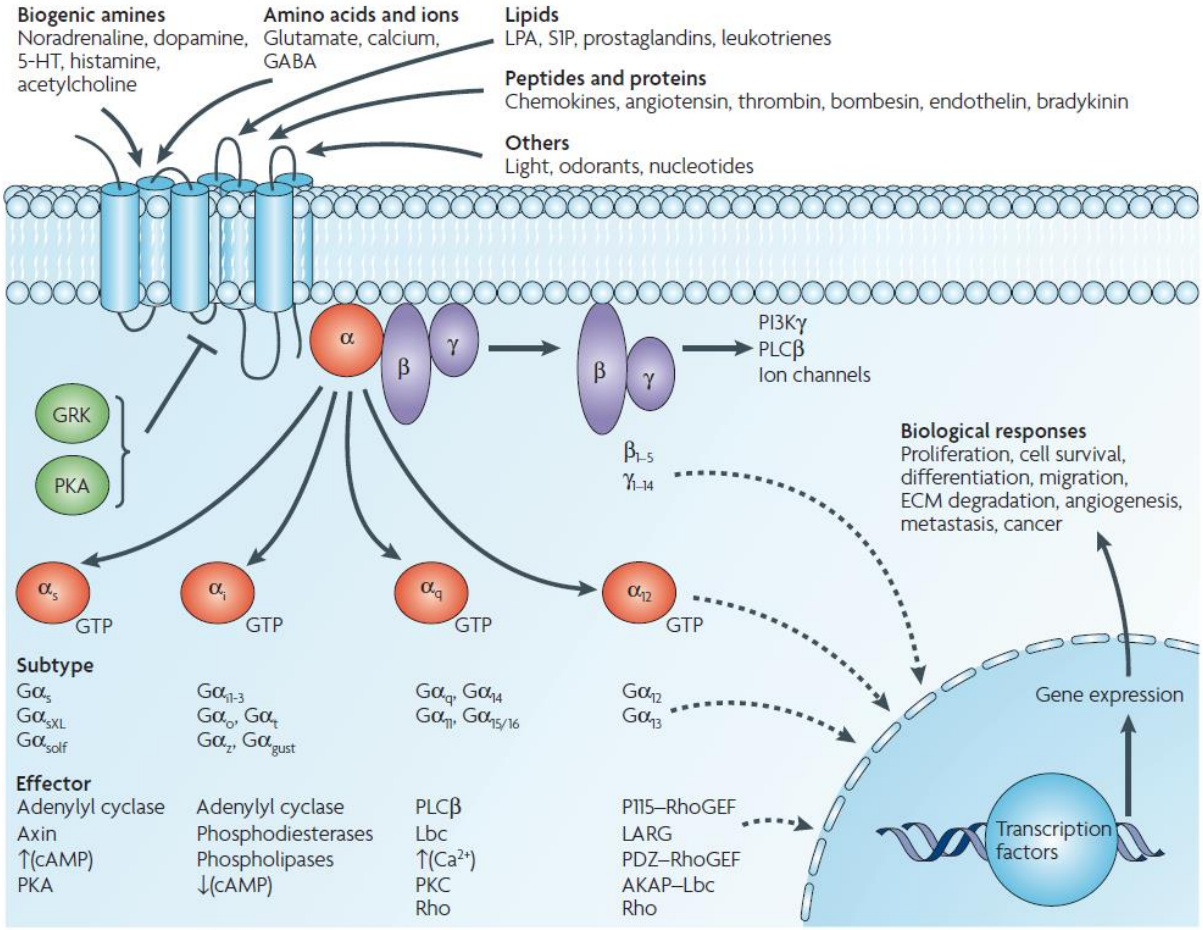


Figura 1. Ligandos endógenos y vías de señalización celular mediadas por GPCRs, responsables de la diversidad de sus funciones biológicas. (Extraído de Dorsam y Gutkind, 2007)

Los últimos avances han demostrado una mayor complejidad en la regulación y la señalización de estos receptores de la que se había revelado inicialmente, incluyendo la señalización mediante vías independientes de proteína G, la existencia de ligandos funcionalmente selectivos capaces de promover eventos de señalización específicos a través de un mismo receptor (ligandos *biased*) y su aceptada capacidad de oligomerización con otros receptores, no únicamente con otros GPCRs sino también con otras familias tales como canales iónicos.

1.1.1 Estructura de los GPCRs

En 1983 se publicó por primera vez la secuencia aminoacídica de un GPCR, el receptor de rodopsina (Hargrave et al., 1983; Nathans and Hogness, 1983), lo que permitió realizar el primer modelo bidimensional que mostró una estructura formada por un ATD extracelular, una secuencia helicoidal que atravesaba la membrana en 7 ocasiones y un dominio carboxilo terminal (CTD) intracelular (Palczewski, 2014). La rodopsina es un GPCR activado por fotones de luz e implicado en la transmisión de la información visual. Palczewski y colaboradores publicaron la estructura cristalina de alta resolución de este GPCR en condiciones de oscuridad, es decir, manteniendo el receptor en un estado de no activación (Palczewski et al., 2000), lo que constituyó el primer modelo tridimensional experimental de un GPCR (Figura 2). Aunque el receptor de rodopsina representa un claro prototipo estructural para el estudio de otros GPCRs, presenta una peculiaridad: la unión covalente de un cromóforo no proteico, el derivado de la vitamina A 11-cis-retinal, a la proteína (opsina). La activación del receptor mediante fotones de luz estimula una proteína G que a su vez induce la activación de una fosfodiesterasa que convierte guanosina monofosfato cíclico (cGMP) a GMP.

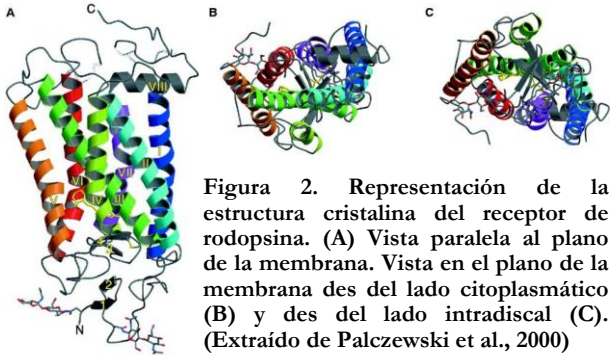


Figura 2. Representación de la estructura cristalina del receptor de rodopsina. (A) Vista paralela al plano de la membrana. Vista en el plano de la membrana des del lado citoplasmático (B) y des del lado intradiscal (C). (Extraído de Palczewski et al., 2000)

Siete años más tarde fue publicada la cristalización de otro GPCR, el receptor β_2-adrenérgico, por parte de los grupos de Kobilka y Schertler (Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007), lo que estableció definitivamente la homología estructural existente con el receptor rodopsina y probablemente con los demás miembros de la superfamilia de GPCRs. En 2011, Rasmussen y colaboradores publicaron la estructura cristalina del complejo ternario activo formado por el receptor β_2-adrenérgico monomérico unido a la vez a un agonista y a una proteína Gs heterotrimérica (Figura 3), que representó la primera visión de alta resolución de la señalización transmembrana de un GPCR (Rasmussen et al., 2011).

Actualmente han sido resueltas más de cien estructuras de GPCRs, la mayoría pertenecientes a la clase A, entre las que encontramos el receptor de adenosina A_{2A}, el de histamina H_1, el de dopamina D_3 y el cannabinoide CB_1 entre otros, así como receptores de las clases B, C y F, como son el receptor de corticotropina CRF_1, los receptores metabotrópicos glutamatérgicos $mGlu_1$ y $mGlu_5$ o el receptor SMO, respectivamente (Shonberg et al., 2015).

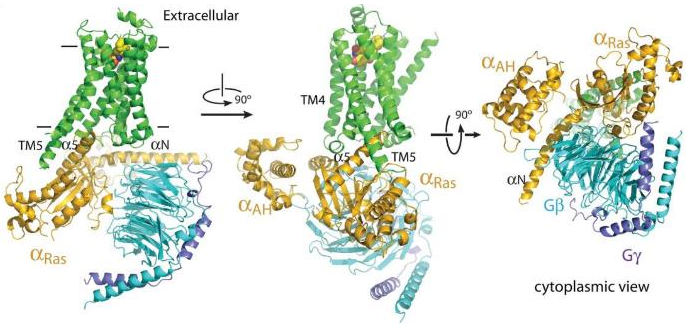


Figura 3. Estructura cristalina del receptor β_2-adrenérgico (verde) unido a un agonista (esferas amarillas) y acoplado a una proteína G heterotrimérica constituida por las subunidades Gαs (naranja), Gβ (azul) y Gγ (lila). (Extraído de Rasmussen et al., 2011)

El enfoque actual en el estudio de GPCRs consiste en el diseño de agonistas y antagonistas en base a dos aspectos: la estructura del receptor y la capacidad de ciertos fármacos de activar específicamente unas vías de señalización en detrimento de otras. Este último aspecto podría representar un nuevo paradigma en el estudio de los GPCRs, sugiriendo la posibilidad de diseñar fármacos que no presenten efectos secundarios no deseados (Gurevich and Gurevich, 2017; Zhou et al., 2017).

1.1.2 Clasificación de los GPCRs

Los GPCRs, para poder ser categorizados como tales, deben presentar una única cadena polipeptídica capaz de cruzar en siete ocasiones la membrana plasmática, por lo que también se les suele nombrar receptores de siete dominios transmembrana (TM), aunque no todos los receptores con dicha estructura señalizan a través de proteínas G. La estructura molecular que permite a los GPCRs atravesar la membrana celular consiste en siete secuencias de 25-35 residuos aminoacídicos con un alto grado de hidrofobicidad, dispuestos en una estructura secundaria de hélices α. Estas hélices están conectadas entre sí por tres bucles intracelulares y tres bucles extracelulares, quedando el ATD orientado hacia el medio extracelular y el CTD hacia el intracelular, formando así una unidad estructural que permite que un ligando extracelular ejerza su efecto específico dentro de la célula.

La cristalización de GPCRs ha revelado motivos altamente conservados: en la hélice TM3, relacionada con la conformación inactiva del receptor y el bloqueo de la unión de la proteína G; en la región citoplasmática de la hélice TM6, con un *micro-switch* que presenta cambios substanciales entre las conformaciones activa e inactiva del receptor; en la hélice TM7, que está fuertemente implicada en la activación del receptor; y entre el segundo bucle extracelular y la hélice TM3, en que se ha descrito un puente disulfuro altamente conservado que juega un papel importante en la estabilización de la región extracelular y que modela la entrada al centro ortostérico (Zhang et al., 2015). La estructura intracelular se encuentra relativamente conservada, hecho que correlaciona con la cantidad limitada de efectores intracelulares con los que se unen. Por otra parte, las regiones más variables se encuentran en los CTDs y ATDs y en las regiones intracelulares de los TM2 y 3 (Caltabiano et al., 2013). El análisis de las estructuras resueltas hasta el momento muestra como los ligandos usualmente se unen a la cavidad principal, localizada entre los segmentos extracelulares de los TM3, 5, 6 y 7 o a la cavidad menor localizada entre los segmentos extracelulares de los TM1, 2, 3 y 7 (Rosenkilde et al., 2010). A pesar de las características comunes de estas cavidades, su tamaño, forma y propiedades electrostáticas difieren de manera considerable entre receptores, incluso entre miembros de la misma subfamilia. Además, también se han descrito diferencias en el mecanismo de aproximación de los ligandos al centro ortostérico: si en la mayoría de receptores se observa una prolongación hidrófila del propio lugar de unión hacia una zona más extracelular facilitando el acceso (Zhang et al., 2015), en los receptores de ligandos lipídicos, el ATD y los bucles extracelulares bloquean la entrada a la cavidad de unión (Hanson et al., 2012), sugiriendo que los ligandos lipofílicos podrían aproximarse al centro ortostérico a través de la bicapa lipídica.

El primer sistema de clasificación que se propuso para la superfamilia de los GPCRs los dividió en seis clases (A-F) en función, básicamente, de su homología de secuencia (Kolakowski, 1994). Actualmente se acepta una clasificación alternativa, conocida como GRAFS por las iniciales de cada familia (*Glutamato*, *Rodopsina*, *Adhesión*, *Frizzled/taste2* y *Secretina*), que divide los GPCRs presentes en vertebrados en cinco familias distintas mediante análisis filogenético (Fredriksson et al., 2003):

- Familia de la rodopsina o clase A: es la mayor familia de GPCRs e incluye receptores para una gran variedad de pequeñas moléculas, neurotransmisores, péptidos y hormonas, además de receptores olfativos, receptores del gusto y receptores para pigmentos visuales. La homología entre este tipo de receptores es baja y limitada a un número de residuos altamente conservados. Los receptores se caracterizan por tener un único residuo conservado en toda la familia que corresponde a la arginina del motivo Asp-Arg-Tyr (DRY,) en el tercer segmento transmembrana (Fraser et al., 1988) y por tener un puente disulfuro que conecta el primer bucle extracelular con el segundo. Entre los miembros de esta familia encontramos los receptores de adenosina, dopamina e histamina entre muchos otros.

- Familia de los receptores de secretina o clase B: incluye receptores para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos de elevado peso molecular. Presentan un largo ectodominio amino terminal (ATD) con múltiples cisteínas que forman una red de puentes disulfuro (Ulrich et al., 1998) y una morfología similar a la familia A, aunque sin homología de secuencia.

- Familia de los receptores de Glutamato o clase C: incluye receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y receptores sensores de Ca^{2+}, como receptores gustativos, olfativos y de feromonas. Presentan un gran dominio extracelular que contiene el centro ortostérico y un dominio rico en cisteínas.

- Familia de receptores de adhesión: se encuentran relacionados filogenéticamente con la familia definida en la primera clasificación como clase B aunque difieren en el ATD, el cual contiene uno o más dominios funcionales generalmente con propiedades adherentes. De hecho, actualmente se cree que esta característica les confiere la capacidad de detectar estímulos mecánicos, es decir, de actuar como mecano-sensores (Scholz et al., 2016). Además, cercano a la región transmembrana contienen el dominio autoproteolítico GAIN (*GPCR-Autoproteolysis INducing domain*), esencial para la escisión del ATD del receptor, quedando unido de forma no-covalente a éste y formando una estructura de dos subunidades.

- Familia de los receptores *frizzled/taste2*: incluye receptores implicados en el control de la diferenciación, proliferación y polaridad celular durante el desarrollo embrionario, entre otros.

Con este nuevo sistema de clasificación, Fredriksson y colaboradores defienden la teoría de que los GPCRs surgieron a partir de un único predecesor común, que evolucionó a través de duplicaciones génicas, desde la mayor simplicidad que presentaba en sus orígenes a la enorme complejidad que muestra esta superfamilia en la actualidad (Fredriksson et al., 2003). La amplia diversidad estructural y funcional de los GPCRs sugiere una gran implicación de estos receptores en la fisiología de cualquier organismo.

1.1.3 Activación y vías de señalización de los GPCRs

Los GPCRs deben su nombre a la capacidad para reclutar e interaccionar con proteínas G heterotriméricas citoplasmáticas, así como para regular su función, gracias a los cambios conformacionales promovidos por la unión de un ligando al receptor en el exterior celular. Las tres subunidades que forman una proteína G reciben la nomenclatura de α (39-46 kDa), β (37 kDa) y γ (8 kDa) y existen varios subtipos con diversidad de funciones. La subunidad Gα, en su

conformación inactiva, tiene gran afinidad para unirse a guanosina difosfato (GDP) y está preparada para interaccionar con el receptor activado, mientras que en su conformación activa adquiere una mayor afinidad por la molécula guanosina trifosfato (GTP), que substituye a la molécula de GDP (Figura 4). Se cree que el intercambio de GDP por GTP desestabiliza el trímero y permite la disociación de la subunidad Gα-GTP del dímero Gβγ. Tanto la subunidad Gα como el dímero Gβγ son moléculas capaces de activar la cascada de señalización correspondiente, involucrando distintas proteínas efectoras (Figura 1). En este caso, el receptor actuaría como un *guanine nucleotide exchange factor* (GEF), provocando que la subunidad Gα libere GDP y se una a GTP (Syrovatkina et al., 2016). El mecanismo catalítico dependiente de la actividad GEF es reversible, es decir, que la unión de GEF no es específica del complejo proteína G-GDP sino que también puede unirse al complejo proteína G-GTP (Stanley and Thomas, 2016).

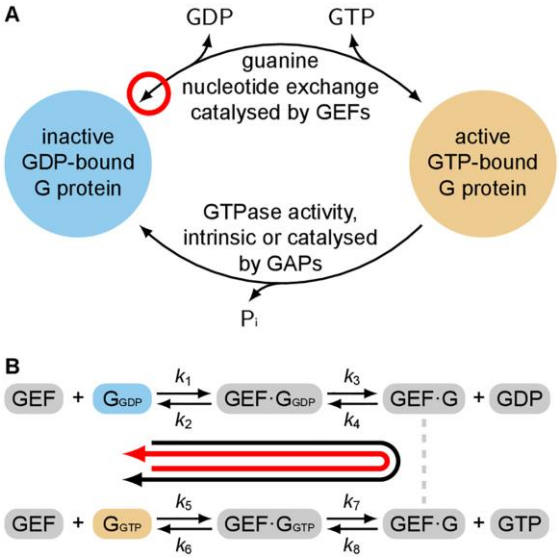


Figura 4. El ciclo de activación de las proteínas G está regulado por factores GEF y por la actividad GTPasa. (A) El círculo rojo pone de manifiesto que el mecanismo asociado a GEF es completamente reversible, (B) dando lugar a distintos complejos GEF-proteína G con constantes cinéticas únicas para cada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

La señalización finaliza, por un lado, mediante la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad Gα, que hidroliza la molécula de GTP a GDP y fosfato. Existen proteínas, como las RGS (*regulators of G protein signaling*) que actúan como GAPs (*GTPase-activating proteins*) para las subunidades Gα, es decir, que promueven y aceleran la actividad GTPasa intrínsecamente lenta de estas subunidades, de manera que deben estar finamente reguladas para el mantenimiento de una apropiada potencia y duración de la señalización (Syrovatkina et al., 2016). Por otro lado, la señalización mediada por el dímero Gβγ finaliza con la reasociación con la subunidad Gα-GDP.

Las proteínas G se identifican por la subunidad Gα que las compone. En base a similitudes de secuencia y funcionalidad, las subunidades Gα se han agrupado en 4 familias: Gαs, Gαi/o, Gαq/11, y Gα12/13 (Simon et al., 1991):

- Familia Gαs: estimulan la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclico (cAMP), un importante segundo mensajero celular capaz de activar dos proteínas quinasas A dependientes de cAMP (PKA), que a su vez fosforilan a múltiples proteínas como receptores, canales iónicos, enzimas o factores de transcripción.

- Familia Gαi/o: inhiben la enzima AC, actuando como freno o regulador negativo de la actividad promovida por las subunidades Gαs. Dependiendo del tipo celular, el dímero Gβγ puede activar la vía de señalización dependiente de la enzima fosfolipasa Cβ (PLCβ), clásicamente acoplada a proteínas Gαq/11, además de canales de potasio, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína tirosina quinasa Src.

- Familia Gαq/11: estimulan la proteína PLCβ, que induce la hidrólisis del lípido de membrana fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP_2) y como resultado se forman los segundos mensajeros inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El primero

provoca la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, lo que conlleva la activación de diversas quinasas dependientes de Ca^{2+}, mientras que el DAG tiene como diana intracelular a la proteína quinasa C (PKC), que constituye una superfamilia de proteínas subdividida en las PKCs convencionales (sensibles a Ca^{2+}, DAG y ésteres de forbol), las PKCs nuevas (con activación independiente de Ca^{2+}) y las PKCs atípicas (insensibles a Ca^{2+} y reguladas por fosfolípidos) (Newton and Johnson, 1998).

- Familia Gα12/13: presentan homología en su secuencia, pero vías de señalización diferenciadas. Gα12 estimula a la proteína fosfolipasa D (PLD), capaz de producir DAG (y por ello de activar a PKCs), proteínas tirosina quinasas como Src y Btk y proteína activadora de la actividad GTPasa para Rho (RhoGAP). Gα13 es capaz de interaccionar con múltiples factores RhoGEF (Siehler, 2009).

Las subunidades Gβ y Gγ forman una única unidad funcional que tan solo puede disociarse bajo condiciones de desnaturalización (Schmidt et al., 1992). Existen 5 subtipos de subunidades Gβ y 12 subtipos de subunidades Gγ y se ha constatado que dímeros formados por diferentes subunidades Gβ y Gγ pueden interaccionar con la misma isoforma de Gα, sugiriendo la importancia de la expresión y la localización subcelular en la regulación de la señalización asociada (Betke et al., 2014).

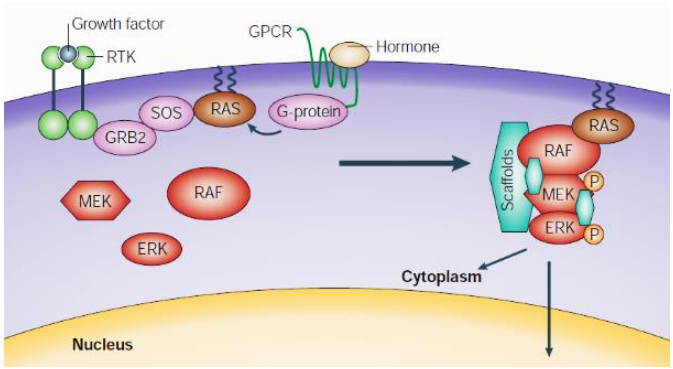


Figura 5. Esquema representativo de la vía de las ERK. (Extraído de Wellbrock et al., 2004)

Las respuestas mediadas por los GPCRs son el resultado de la integración de diversas redes de señalización. Uno de los principales y más estudiados efectores son las *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), también llamadas *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs), que incluyen ERK1 y ERK2, aunque existen otras cascadas que funcionan en paralelo a ésta, como son las de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), p38MAPK y ERK5 (Bogoyevitch and Court, 2004). ERK1 y ERK2 son quinasas que presentan una homología del 85% en su secuencia y constituyen una pieza central en cascadas de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares como la proliferación, crecimiento, diferenciación, migración, supervivencia y apoptosis. Las proteínas ERK1/2 no fosforiladas se encuentran en estado inactivo y formando un complejo junto a las proteínas Raf, MEK (*MAPK/ERK kinase*) y otras proteínas de anclaje que determinan su localización subcelular. La activación de las quinasas ERK1/2 se produce por la fosforilación secuencial de Raf y MEK, lo que conlleva su liberación del complejo y la fosforilación de más de 150 substratos distintos (Yoon and Seger, 2006). La disposición en complejos proteicos facilita la fosforilación secuencial y la adecuada amplificación y regulación de la señal transmitida, donde la isoforma B-Raf parece tener un papel principal actuando como conector entre Ras y MEK (Wellbrock et al., 2004) (Figura 5). La proteína Ras puede ser activada, no sólo a través de proteínas G asociadas a GPCRs, sino también por cascadas iniciadas por receptores con actividad tirosina quinasa (RTK). Es más, se observó que en ausencia de ligandos para receptores RTK, la activación de GPCRs podía inducir la estimulación de un RTK generando una cascada de señalización idéntica a la iniciada por su propio ligando (McKay and Morrison, 2007). Este fenómeno recibe el nombre de transactivación y es iniciado por las subunidades Gβγ, dando lugar al reclutamiento de Sos hacia la membrana y activando así el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras. Además de por el dímero Gβγ, la activación de Ras puede producirse a

través de Gαs, Gαi/o y Gαq/11. Por otra parte, se ha reportado que la inhibición de PKA y PKC, quinasas importantes de las vías de señalización dependientes de proteína G, evitan la activación de ERK1/2 (Gesty-Palmer et al., 2006).

En la última década se ha demostrado que muchos GPCRs son capaces de activar las quinasas ERK1/2 por vías independientes de proteína G, como es la vía mediada por las proteínas β-arrestinas (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007), proteínas compuestas por dos dominios ATD y CTD formados por láminas β antiparalelas y conectadas por una región bisagra (Granzin et al., 1998). Cuando la cascada de señalización se produce a través de proteína G, la activación de ERK1/2 se da en una fase temprana, de pocos minutos, mientras que las β-arrestinas generalmente lo hacen en una fase más tardía (Azzi et al., 2003), debido seguramente al ensamblaje de la maquinaria celular requerida para la internalización del receptor (Figura 6), aunque recientemente ha sido publicado que la internalización no tiene porqué ser estrictamente necesaria, al menos para el receptor β_1-adrenérgico (Eichel et al., 2016; Ranjan et al., 2016).

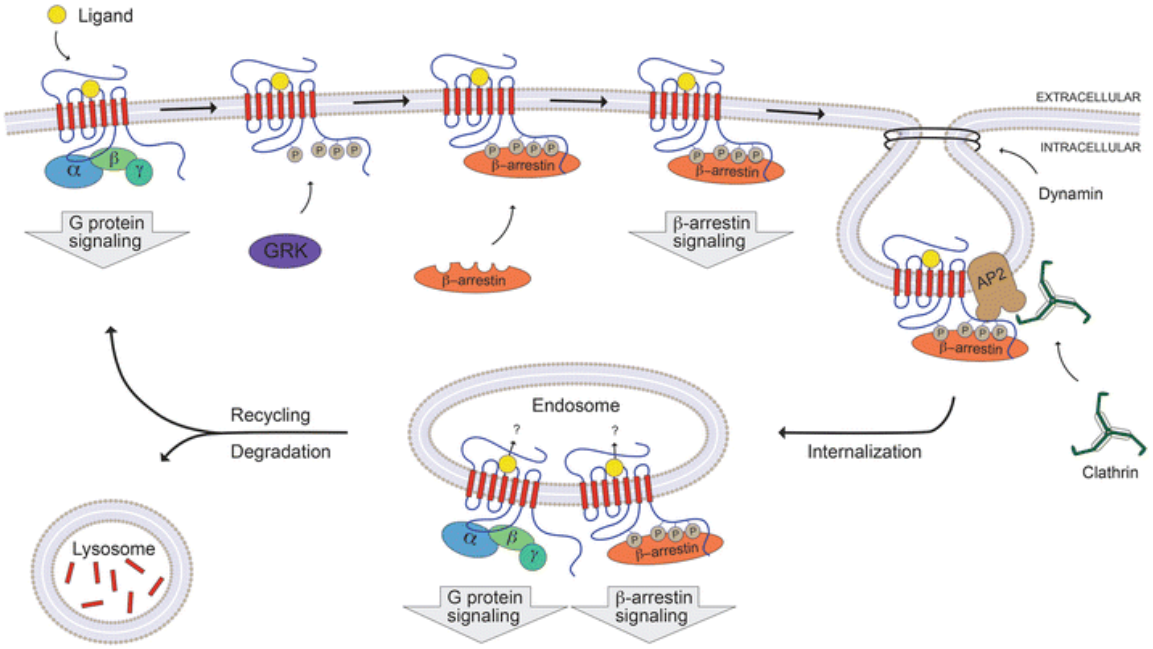


Figura 6. Señalización, internalización y tráfico intracelular de los GPCRs. (Extraído de Foster and Bräuner-Osborne, 2017)

Así pues, se ha descrito un nuevo mecanismo para la señalización por la vía de las MAPKs mediada por β-arrestinas que no implica la internalización del receptor (Figura 7), según el cual el GPCR se disocia del complejo formado por la β-arrestina y las estructuras recubiertas de clatrina (CCS) antes de que se inicie la señalización vía MAPK y sin formación de vesículas endocíticas (Eichel et al., 2016).

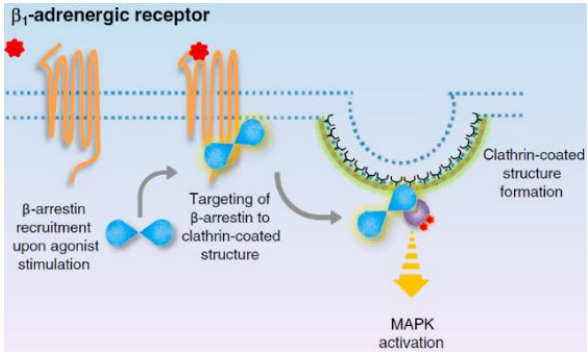


Figura 7. Fenómeno de *kiss and remember* descrito para el receptor β_1-adrenérgico. Después de la disociación del receptor, la β-arrestina se acumula en las CCS y transduce la señal vía MAPK desde estas estructuras. (Extraído de Ranjan et al., 2016)

Por último, lo que determinará la localización subcelular de ERK1/2 activadas y la intensidad de la respuesta celular serán las proteínas con las que interaccionen estas quinasas, así como

la selectividad, tiempo de actuación y concentración de los ligandos iniciadores de la señalización, promoviendo destinaciones citoplasmáticas o bien nucleares (Volmat and Pouysségur, 2001).

1.1.4 Actividad constitutiva y activación por ligandos de los GPCRs

En 1984, Cerione y colaboradores observaron que, en un sistema que expresaba el receptor β_2-adrenérgico purificado y la proteína Gs heterotrimérica, el receptor podía encontrarse activo en ausencia de ligando (Cerione et al., 1984). A este fenómeno se le llamó actividad constitutiva o actividad basal del receptor. Más adelante, este fenómeno también fue descrito en una línea celular que expresaba de forma endógena el receptor δ-opioide (δOR), en la que antagonistas competitivos del receptor mostraban una actividad intrínseca negativa al disminuir la actividad GTPasa en ausencia de agonista (Costa and Herz, 1989).

Los GPCRs son proteínas dinámicas que adoptan distintas conformaciones dependiendo del ligando unido, de las proteínas efectoras asociadas y de su entorno en la membrana (Deupi and Kobilka, 2010; Yao et al., 2009b). En lo referente a los ligandos que pueden unirse a un GPCR, clásicamente se clasificaban en agonistas (totales o parciales), antagonistas y agonistas inversos (totales o parciales): los agonistas promueven y estabilizan la conformación activa del receptor, siendo el agonista total el que promueve la conformación más favorable para su señalización; los antagonistas se unen al centro ortostérico, pero sin influir en el equilibrio entre las formas activa e inactiva del receptor; los agonistas inversos, por su parte, inhiben la actividad constitutiva del receptor induciendo su estabilización en la conformación inactiva (Figura 8). Este modelo se conoce como *modelo de los dos estados* y considera el estado basal como la conformación inactiva del receptor (Huang et al., 2013; Nygaard et al., 2013) (Figura 9b).

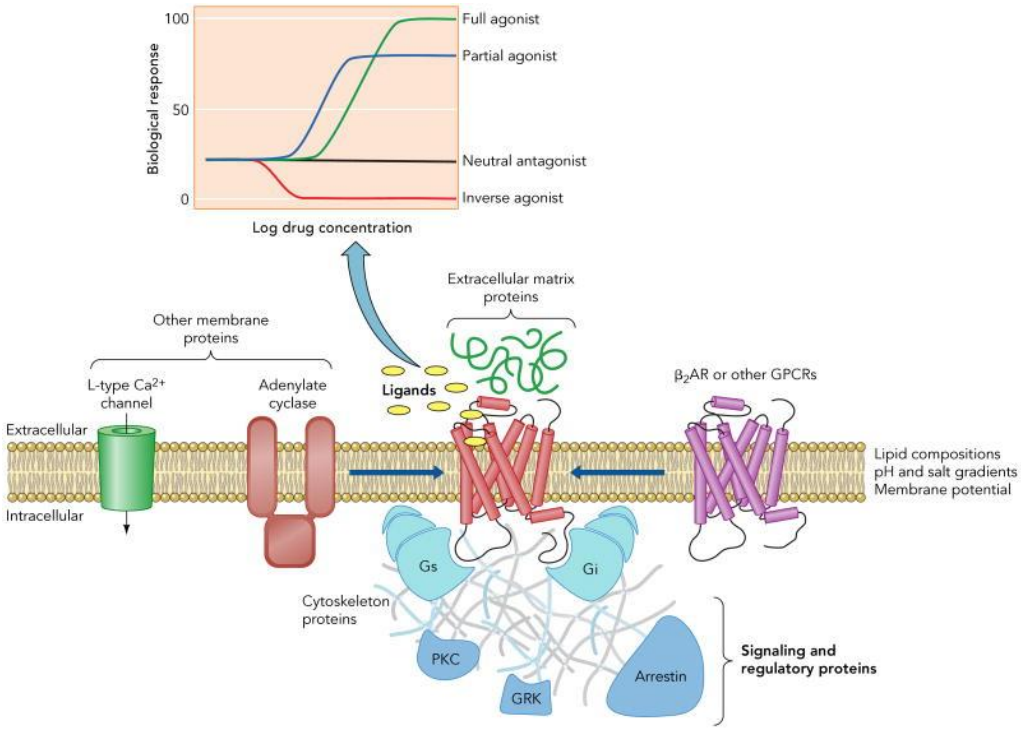


Figura 8. Factores que influyen en la señalización de un GPCR. Además de la variabilidad en la eficacia de los ligandos, muchos otros factores son capaces de alterar la señalización de un GPCR, como la composición de la bicapa lipídica, el pH, el potencial de membrana, las interacciones proteína-proteína o las modificaciones postraduccionales del receptor. (Extraído de Deupi and Kobilka, 2010)

Alternativamente, se han planteado dos posibles *modelos de tres estados* para el receptor: uno sugiere un estado intermedio basal en el que el receptor muestra cierta actividad, de manera que los agonistas inversos favorecerían la transición hacia el estado inactivo y los agonistas hacia el estado totalmente activo (Figura 9a); el otro modelo sugiere una conformación inactiva del receptor en estado basal, de manera que los agonistas favorecen la transición a estados intermedios y son los efectores quienes promueven el estado de activación completa (Figura 9c).

El modelo de tres estados no contradice los resultados de Huang y colaboradores y está respaldado por estudios de cristalización y resonancia magnética, en los que se observa que los mayores cambios estructurales que experimenta el receptor al activarse sólo se detectan cuando ha sido co-cristalizado junto con una proteína G o bien con un anticuerpo capaz de mimetizar el efecto de la proteína G. Estos hallazgos sugieren que, en presencia únicamente del agonista, el receptor transita entre diferentes conformaciones intermedias, que acabarán por estabilizarse en una conformación completamente activa gracias a la asociación con la proteína efectora (Figura 9c).

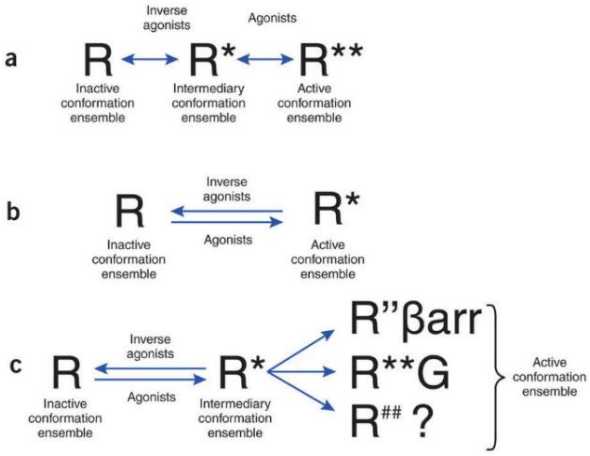


Figura 9. Modelos alternativos que describen la transición entre los estados activo e inactivo en los GPCRs. (Extraído de Bouvier, 2013).

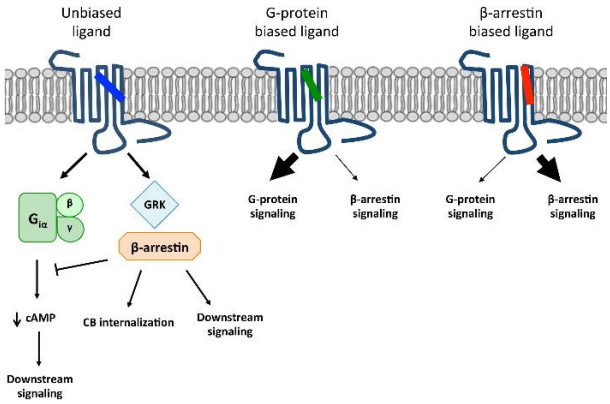


Figura 10. Representación esquemática de la selectividad funcional de tres ligandos para un mismo GPCR. (Extraído de Mallipeddi et al., 2017)

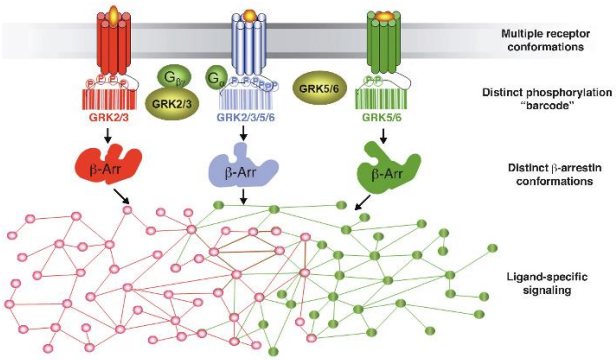


Figura 11. Hipótesis *barcode* que explica las distintas funciones de las β-arrestinas. Las conformaciones únicas del receptor inducidas por ligandos *biased*, reclutan subconjuntos únicos de GRKs que originan patrones de fosforilación diferenciales (Extraído de Wisler et al., 2014)

En base a estas observaciones, existirían distintas conformaciones activas del receptor con una afinidad diferencial para unirse a las distintas proteínas efectoras a las que se asocia, lo que permite explicar por primera vez el fenómeno del *ligand-biased signaling* o de selectividad funcional, en que diferentes ligandos para un mismo receptor son capaces de activar de forma diferencial distintas vías de señalización (Mallipeddi et al., 2017; Rankovic et al., 2016) (Figura 10). Consecuentemente, la clasificación clásica de los ligandos como agonistas, agonistas inversos o antagonistas deberá ser revisada y probablemente reformulada, ya que una molécula podría ser considerada agonista total al estudiar unas vías de señalización y antagonista al analizar otras vías (van der Westhuizen et al., 2014). Además, la selectividad funcional se observa también a nivel de la señalización por β-arrestinas, ya que se ha descrito que la función final de la β-arrestina depende del patrón de fosforilación o *barcode* del receptor hacia el cual es reclutada (Figura 11). Esta fosforilación del receptor en su CTD es llevada a cabo por unas quinasas serina-treonina específicas (GRK) y el *barcode* resultante dependerá del subconjunto

específico de GRKs que hayan participado, que a su vez dependerá del ligando *biased* que se haya unido al receptor (Bahouth and Nooh, 2017; Wisler et al., 2014; Yang et al., 2017; Zidar et al., 2009). Esto es consistente con trabajos previos con múltiples GPCRs en que se describió el requerimiento de GRK2 y GRK3 para la internalización del receptor, mientras que la fosforilación por GRK5 y GRK6 era necesaria para la señalización vía ERK1/2 dependiente de β-arrestina (Jones et al., 2007; Kara et al., 2006). El fenómeno de la selectividad funcional, además, presenta la particularidad de ser dependiente del tiempo de activación y del tipo celular (Benredjem et al., 2017; Grundmann and Kostenis, 2017), de manera que el *bias* detectado para un ligando *in vitro* podría no predecir lo que ocurre *in vivo* (Luttrell et al., 2018).

Por último, entre los ligandos que pueden unirse a un GPCR se encuentran, por un lado, los llamados endógenos o ligandos propios del organismo, que pueden unirse al centro ortostérico del receptor y, por otro lado, los ligandos alostéricos, que se unen a lugares topográficamente distintos: los centros alostéricos (Melancon et al., 2012). Esto les confiere a muchos ligandos alostéricos la capacidad de modificar la actividad del receptor mediante la inducción de cambios conformacionales que se transmiten desde el centro alostérico hasta el ortostérico o bien directamente hasta las proteínas efectoras (Wootten et al., 2013). Existe evidencia prometedora de la utilidad potencial de este tipo de ligandos, por su mayor selectividad farmacológica y potencialmente menores efectos adversos, en múltiples enfermedades del SNC (Nickols and Conn, 2014) (véase apartado 1.2.2. Alosterismo en los GPCRs).

1.1.5 Regulación de la actividad de los GPCRs

Los GPCRs presentan una gran movilidad en la célula, no sólo durante su ensamblaje y transporte trans-membranal a través de distintos compartimentos, sino que también presentan movimiento por difusión en la membrana celular (Latorraca et al., 2017). Su señalización está fuertemente regulada a nivel temporal y espacial por múltiples factores, como son la disponibilidad del ligando, las propiedades intrínsecas del receptor y de la proteína G, las interacciones con otras proteínas intracelulares, así como el grado de expresión del receptor en la membrana celular y su tráfico intracelular (Foster and Bräuner-Osborne, 2017).

La interacción prolongada de un agonista con un GPCR frecuentemente resulta en una rápida pérdida o atenuación de la respuesta, evitando así los posibles efectos adversos de una sobreestimulación celular. Este mecanismo de regulación negativa llamado desensibilización puede manifestarse mediante múltiples procesos, como es el desacoplamiento entre el receptor y la proteína G como consecuencia de la fosforilación del receptor, cuyo destino está precisamente regulado por los motivos fosforilados o *barcode* que presente, que a su vez dependerán del ligando específico inductor de la señal y las GRKs disponibles, determinando su retención en la membrana plasmática, su reciclaje, su degradación o bien su señalización desde el endosoma (Bahouth and Nooh, 2017). Así pues, la internalización y posible degradación del receptor mediadas por la actuación de las GRKs, así como la disminución del número de receptores debido a la disminución del RNA mensajero y de la síntesis proteica, son otros de los posibles mecanismos de desensibilización (Moore et al., 2007), ya que se traducen finalmente en un menor número de receptores capaces de interactuar con el ligando y, por lo tanto, de iniciar cascadas de señalización. En el caso de las fosforilaciones, son fenómenos que tienen lugar en segundos, mientras que se necesitan minutos en el caso de la endocitosis y horas para regular la expresión de los receptores. Además, la desensibilización del receptor puede ser completa, como ocurre en el sistema olfativo y visual, o atenuada, disminuyendo la respuesta máxima, como ocurre con el receptor β_2-adrenérgico (Dohlman et al., 1991).

Además de la regulación directa sobre el GPCR, existe la posibilidad de regular su señalización actuando sobre las proteínas implicadas en ella. Con respecto a la activación de la proteína G, se trata de un proceso dinámico y su cinética está regulada por las proteínas aceleradoras de su actividad GTPasa intrínseca, las proteínas RGS, así como por las propias proteínas efectoras. Las RGSs coordinan el posicionamiento del residuo catalítico de Gα que es crítico para su actividad GTPasa, estabilizando el estado de transición de la subunidad Gα (Gα-GDP) y acelerando la terminación de la señalización (Kimple et al., 2011). Recientemente, se ha descrito la reversibilidad de la actividad catalítica de proteínas GEF, revelando un nuevo mecanismo de inactivación de la proteína G (Stanley and Thomas, 2016) (véase apartado 1.1.3. Activación y vías de señalización de los GPCRs).

Con respecto al reclutamiento de β-arrestinas, que constituye un mecanismo universal de todos los GPCRs (Kohout and Lefkowitz, 2003), se han descrito cuatro proteínas distintas: las formas 1 y 4, también llamadas arrestinas visuales, que se unen a la forma activa del fotoreceptor rodopsina fosforilado, y las formas 2 y 3, que regulan la actividad de los GPCRs no visuales (Gurevich and Gurevich, 2006). Una vez internalizados, los GPCRs se dividen en dos subcategorías dependiendo del tipo de unión a la β-arrestina (Oakley et al., 2000; Thomsen et al., 2016). Por un lado, los receptores de la clase A se separan de la β-arrestina al internalizarse, de manera que pueden ser desfosforilados y reciclados de nuevo a la membrana o bien seguir señalizando desde los endosomas, aumentando la eficiencia de las vías transcripcionales al verse reducida la distancia al núcleo (Tsvetanova and von Zastrow, 2014). Por otro lado, los receptores de la clase B mantienen la unión con la β-arrestina, de manera que la fosforilación mediada por proteínas GRK puede acabar induciendo la ubiquitinización del receptor. Se han identificado las proteínas de la familia GASP (*GPCR-associated sorting protein*), que se unen al receptor y asisten en la decisión de reciclarlo o degradarlo (Bornert et al., 2013). Aunque originalmente las β-arrestinas se definieron como terminadores de la señal mediada por proteínas G, hoy en día se consideran adaptadores multifuncionales (Jean-Charles et al., 2017), ya que además juegan un importante papel como adaptadores endocíticos, poniendo en contacto los receptores con la maquinaria de endocitosis mediada por clatrina (Claing et al., 2002), así como en la transducción de la señal, que puede incluso conllevar la translocación de la β-arrestina al núcleo y la activación de genes concretos (Beaulieu and Caron, 2005; Shenoy and Lefkowitz, 2011). Las arrestinas unen un gran número de proteínas catalíticamente activas reclutadas por los GPCRs activados, entre ellas proteínas de la familia de tirosina quinasas Src, componentes de la familia de las MAPK como ERK1/2 y JNK3, ubiquitina ligasa E3, fosfodiesterasas de cAMP (PDE) y DAG quinasas, entre otras (Luttrell and Gesty-Palmer, 2010). En la última década, se ha evidenciado que las β-arrestinas también participan en muchos procesos de señalización celulares independientes de receptor, afectando a importantes funciones celulares como la adhesión, motilidad, supervivencia y apoptosis (Gurevich and Gurevich, 2017).

Tradicionalmente, se ha considerado que la señalización mediada por GPCRs únicamente se originaba en la membrana celular por interacción con estímulos externos. Sin embargo, investigaciones recientes muestran que numerosos GPCRs están también asociados con varias membranas intracelulares, como las endosomales, las nucleares o las mitocondriales, donde se acoplan a diversos sistemas de señalización, muestran patrones únicos de desensibilización y/o exhiben distintos patrones de distribución subcelular. Así, aunque muchos GPCRs son activados en la membrana celular, otros GPCRs intracelulares pueden ser activados *in situ* ya sea vía síntesis *de novo* de sus ligandos, por difusión de ligandos permeables o bien por transporte activo de ligandos no permeables (Jong et al., 2017), hecho que desde un punto de vista farmacológico debe ser considerado en el desarrollo de nuevos ligandos para GPCRs.

1.2 Oligomerización de GPCRs

Debido a su estructura y localización, los GPCRs tienen la capacidad de interaccionar con otras proteínas, no solo por el lado extracelular e intracelular de la membrana plasmática, sino que también exhiben interacciones proteína-proteína con otros receptores o canales iónicos a nivel de membrana plasmática (Franco et al., 2003; Rojas and Dingledine, 2013). Estas interacciones pueden afectar a las propiedades del receptor, como su conformación o compartimentación celular, así como promover el ensamblaje en complejos proteicos o clústeres que integran una función (Gingell et al., 2016).

Clásicamente, los GPCRs se habían considerado como entidades monoméricas capaces de transducir la señal iniciada por la unión del ligando mediante una reacción en cadena capaz de amplificarse intracelularmente. Sin embargo, en los años noventa aparecieron evidencias bioquímicas y biofísicas que no podían ser explicadas considerando a los GPCRs de manera individual, dando paso a un nuevo enfoque en su estudio considerando la posibilidad de su oligomerización. Este fenómeno pone de manifiesto la capacidad de los GPCRs para interaccionar entre sí formando complejos homodiméricos, heterodiméricos y oligoméricos de orden superior (Bouvier, 2001; Ferré et al., 2009), dando lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas. El término *homómero de receptores* hace referencia al complejo molecular que combina dos o más receptores individuales funcionales e idénticos, mientras un *heterómero de receptores* es un complejo macromolecular formado por la unidad mínima de dos receptores individuales, funcionales y distintos entre sí, que constituyen una única unidad con propiedades bioquímicas y funcionales demostrablemente diferentes a las de sus componentes individuales (Ferré et al., 2009). De ambas definiciones, además, se desprende la posible formación de multímeros u oligómeros de receptores de orden superior (Carriba et al., 2008; Guo et al., 2008). Las primeras evidencias sobre interacciones receptor-receptor a nivel de SNC se obtuvieron mediante el estudio de la regulación por neuropéptidos de receptores de dopamina y serotonina (Fuxe et al., 1983). Más adelante, Maggio y colaboradores demostraron la existencia de una interacción cruzada o *crosstalk* intermolecular entre receptores muscarínicos y adrenérgicos. Para ello transfectaron células COS-7 con estructuras quiméricas formadas por los receptores α_2 adrenérgicos (α_2R) y M_3 muscarínicos (M_3R) M_3R-α_2R y α_2R-M_3R, en las que el CTD que contiene los segmentos TM6 y TM7 fue intercambiado entre ambos receptores. Al transfectar los mutantes de α_2R o M_3R individualmente no se detectó ningún tipo de unión de ligandos, pero al transfectar ambos se observó la aparición de sitios de unión con propiedades similares a los receptores *wild type* (Maggio et al., 1993), sugiriendo la capacidad de interacción de ambos receptores a nivel molecular.

Hasta la década de los 90, las representaciones de Scatchard no lineales (ecuaciones utilizadas para calcular las constantes de afinidad de un ligando por una proteína) se interpretaban asumiendo diversos grados de acoplamiento entre receptores monoméricos y proteínas G (Franco et al., 2003). La interacción directa entre GPCRs formando dímeros permitió dar otra explicación sin necesidad de incluir la interacción con proteínas G en la ecuación. Efectivamente, la presencia de dímeros y la existencia de cooperatividad en la unión de ligandos, sea negativa o positiva, justifica porqué un agonista aparentemente modifica el porcentaje de receptores con elevada afinidad por el ligando, respecto a los que muestran baja afinidad por el mismo (Casadó et al., 1991; Wreggett and Wells, 1995). Es el caso del heterómero formado por los receptores de adenosina A_1 (A_1R) y de dopamina D_1 (D_1R), en el que los agonistas de A_1R inhiben la unión de análogos de la dopamina al D_1R, de manera que, a nivel fisiológico en el estriado, antagonistas del A_1R inducen un aumento de la actividad locomotora mediada por dopamina (Ginés et al., 2000a). De manera análoga ocurre en el heterómero de receptores A_{2A}-D_2, en el que la activación de A_{2A}Rs disminuye la unión de dopamina a D_2Rs. De hecho, en Japón se aprobó en 2013 el uso

de la istradefilina o KW-6002 (comercializado como Nouriast®), un antagonista selectivo de los A_{2A}Rs que reduce las disquinesias asociadas a los tratamientos a largo plazo con fármacos antiparkinsonianos clásicos como la levodopa (Dungo and Deeks, 2013). Por lo tanto, uno de los papeles de la dimerización es la regulación dinámica en la membrana plasmática mediada por la unión de ligando, además del establecimiento de cooperatividad o modulación alostérica positiva o negativa, que permite potenciar o atenuar la señal o inducir cambios en la selectividad de proteínas G (Terrillon and Bouvier, 2004).

La Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR) publicó tres criterios consensuados para facilitar la clasificación de auténticos heterómeros de GPCRs (Kenakin et al., 2010). El primero es el requerimiento de evidencia de la interacción física receptor-receptor; el segundo criterio exige que los heterómeros deben exhibir propiedades distintas de las de los protómeros y, el tercero, que la disrupción del heterómero debe conllevar una pérdida de las propiedades específicas de dicho heterómero, debiendo cumplirse los tres criterios en cultivos primarios o bien en tejido nativo. En la práctica, hay muy pocos heterómeros identificados que cumplan los tres criterios, principalmente por la dificultad que conlleva el tercero, de manera que actualmente se considera que el cumplimiento de dos de los tres criterios es suficiente para la aceptación como heterómero de GPCRs (Jonas and Hanyaloglu, 2017).

La transcendencia de la oligomerización va más allá de la modulación funcional a nivel de membrana plasmática (Terrillon and Bouvier, 2004) (Figura 12). En algunos casos, este fenómeno es clave en la maduración del receptor o proceso ontogénico, como es la salida del retículo endoplasmático (RE), un paso crucial que regula la expresión de los GPCRs en la superficie celular, en que la oligomerización permite enmascarar las señales de retención en el RE (Reddy and Corley, 1998). Un ejemplo en que este fenómeno resulta hasta necesario es el del receptor de ácido γ-aminobutírico tipo B ($GABA_B$), miembro de la familia C de GPCRs y compuesto por las subuniades $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$ (Marshall et al., 1999). La subunidad $GABA_{B1}$, cuando es expresada sola, queda retenida en el RE, mientras que la subunidad $GABA_{B2}$ sí es capaz de llegar a la membrana plasmática pero no es funcional. En este caso, la heterodimerización permite enmascarar la secuencia de retención de $GABA_{B1}$ y la expresión de un receptor funcional en la membrana celular.

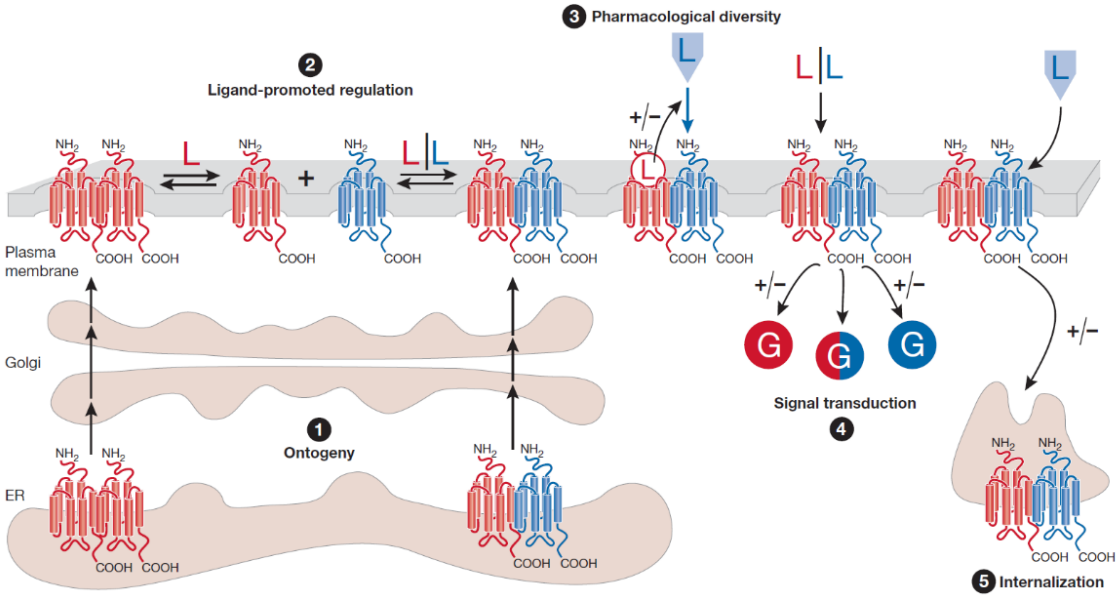


Figura 12. Potenciales implicaciones funcionales de la oligomerización durante el ciclo de vida de los GPCRs G=proteína G; L = ligandos; ER = retículo endoplasmático. (Extraído de Terrillon and Bouvier, 2004).

Además de afectar a la unión del ligando o a la interacción con las proteínas efectoras, la formación de heterómeros puede promover su co-internalización tras la estimulación de únicamente uno de los protómeros del complejo o, alternativamente, la presencia en el complejo de un protómero resistente a la internalización puede inhibir la internalización del complejo (Milligan, 2010) (Figura 12).

En la actualidad, muchas interacciones entre GPCRs así como entre GPCRs y otras familias proteicas están plenamente aceptadas y se consideran cruciales para entender la gran variedad de comunicaciones cruzadas o *crosstalk* farmacológicos y funcionales observados, especialmente para receptores de neurotransmisores en un sistema tan organizado y complejo como es el cerebro.

1.2.1 Interfaces entre GPCRs y dominios de interacción con la proteína G

La oligomerización de GPCRs se puede producir mediante interacciones moleculares directas entre los receptores, pudiendo además involucrar proteínas que permitan la formación y estabilización de estructuras complejas, o bien indirectas, mediante la unión de los dominios intracelulares de los receptores con proteínas citosólicas, las cuales pueden ser de andamiaje o bien estar implicadas en la transducción de la señal (Ciruela et al., 2005).

Por lo que respecta a las interacciones directas entre GPCRs, se han definido diversas interfaces de contacto entre los protómeros. Mediante experimentos de enlaces cruzados o *cross-linking* de cisteínas, se ha descrito la implicación de interacciones hidrofóbicas en los segmentos TM1, 4 y 5 en la oligomerización de GPCRs (Guo et al., 2005, 2008; Hu et al., 2012a). Además, la resolución de múltiples estructuras como las de los receptores μ-opioide (μOR) (Manglik et al., 2012) y β_1-adrenérgico (Huang et al., 2013) formando homo-oligómeros ha revelado la existencia de dos interfaces de contacto, implicando los TM1 y 2 en la primera interfaz y los TM4 y 5 o 5 y 6 en la segunda. Sin embargo, aunque parece existir un patrón similar de interfaces, éste puede variar entre oligómeros e incluso para distintas conformaciones del mismo oligómero, añadiendo aún más variabilidad si se tiene en cuenta que ligandos específicos capaces de estabilizar al receptor en una conformación determinada pueden también afectar a las interfaces implicadas en la formación del oligómero (Ferré et al., 2014).

Actualmente, la estequiometría receptor-proteína G sigue siendo un tema de debate. Los receptores en estado monomérico son capaces de activar a proteínas G, según se demostró para los receptores β_2-adrenérgico, rodopsina y μOR mediante experimentos con *nanodiscs*, es decir, discos a escala nanométrica formados por una bicapa lipídica estabilizada mediante proteínas MSP (*membrane scaffold proteins*) generalmente proteína apoA-1 humana de alta densidad (Bayburt et al., 2007; Kuszak et al., 2009; Whorton et al., 2007). Además de estos receptores de la familia A de GPCRs, también se han reportado miembros de la familia C capaces de activar completamente la proteína G en una estequiometría 1:1 (El Moustaine et al., 2012). En cambio, otros estudios principalmente estructurales demuestran la necesidad de una estequiometría 2:1 (Han et al., 2009; Pellissier et al., 2011).

El hecho que GPCRs de la familia A hayan mostrado funcionalidad como entidades monoméricas en *nanodiscs*, no excluye que puedan formarse oligómeros espontáneamente en células vivas ni tampoco determina que el monómero sea la unidad mínima funcional *in vivo*. Existen múltiples evidencias bioquímicas y estructurales a favor del dímero como unidad mínima de señalización y unido a una única proteína G, que sugieren la existencia en las proteínas G de dos regiones distintas de interacción con los GPCRs (Ferré et al., 2014; Oldham and Hamm, 2006). El primer sitio de unión se encuentra en la hélice de la CTD de la subunidad Gα, que penetra en una fisura accesible entre los bucles intracelulares 2 y 3 tras el cambio de

conformación debido a la activación del receptor (Flock et al., 2015; Hofmann et al., 2009); el segundo se encuentra en la CTD de la subunidad Gγ. En la proteína G heterotrimérica, ambos sitios de unión se encuentran a una distancia de 55 Å, distancia superior a los 45 Å que ocupa aproximadamente un GPCR en el plano de la membrana, indicando que una única proteína G contacta con dos receptores de una manera asimétrica, como así sugiere la estructura del receptor de rodopsina (Filipek et al., 2004; Johnston and Siderovski, 2007; Palczewski et al., 2000). De esta manera, si dos receptores están interaccionando en la membrana, tan solo hay espacio para una sola proteína G, dando como resultado una estructura estable y completamente funcional.

Se realizaron simulaciones de los receptores β_1- y β_2- adrenérgicos que sugerían un modelo de oligomerización en el que homodímeros estables que implican al segmento TM1 difundirían por la membrana plasmática y transitoriamente serían capaces de interactuar con otros protómeros/dímeros mediante otras hélices TM como la TM4 (Johnston et al., 2012). De acuerdo con estas predicciones, el análisis matemático de resultados obtenidos con experimentos de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) cuantitativo con el receptor muscarínico M_3 era compatible con la existencia de dímeros estables de este receptor, una gran fracción de los cuales interactuaban dinámicamente para formar tetrámeros que se disponían específicamente con una arquitectura en forma de rombo, en lugar de una configuración lineal o cuadrada (Patowary et al., 2013). Más recientemente, se ha publicado también la existencia del heterotetrámero formado por homodímeros de receptores de adenosina A_{2A} y homodímeros de receptores de dopamina D_2 (Bonaventura et al., 2015; Navarro et al., 2018), en el que se han definido dos interfaces de contacto distintas: TM6 para los homodímeros y TM4/5 para el heterodímero, así como el heterotetrámero formado por homodímeros de receptores A_1 y homodímeros de receptores A_{2A} (Navarro et al., 2016), que también presenta una arquitectura en forma de rombo y está unido a dos proteínas G distintas, Gαs y Gαi/o, estableciéndose como interfaces de contacto los TM4/5 para el homodímero y los TM5/6 para el heterodímero.

En conjunto, las evidencias obtenidas hasta el momento sugieren que la estructura pentamérica constituida por un homodímero de GPCRs y una proteína G heterotrimérica formarían la principal unidad funcional, de manera que las entidades oligoméricas se interpretan como múltiples dímeros. Sin embargo, se debe resolver para cada GPCR si los heterómeros son preferencialmente heterodímeros o bien si están mayoritariamente constituidos por heterómeros de homodímeros (Ferré et al., 2014).

1.2.2 Alosterismo en GPCRs

La gran mayoría de ligandos se unen al GPCR por el mismo sitio que el ligando agonista endógeno, es decir, por el centro ortostérico. Los ligandos alostéricos, en cambio, se unen por un sitio topográficamente distinto, el sitio alostérico, e influyen en la unión o la función del mismo u otro ligando al unirse a un lugar distinto (Christopoulos and Kenakin, 2002) (Figura 13).

Aunque la cara extracelular del receptor puede representar el sitio de unión más común para los moduladores alostéricos, también se han descrito algunos en la cara intracelular, tal como revela la estructura cristalina del receptor de glucagón (Jazayeri et al., 2016). Además, un buen número de ligandos endógenos pueden también actuar como moduladores alostéricos (van der Westhuizen et al., 2015). Algunos ejemplos de ligandos alostéricos endógenos son el ion sodio, que modula negativamente la unión y activación de agonistas en muchos GPCRs; fosfolípidos como el fosfatidilglicerol que favorece la activación del receptor o la fosfatidiletanolamina que impide su activación; e incluso proteínas G, afectando a la conformación del sitio ortostérico incluso en ausencia del ligando ortostérico (Latorraca et al., 2017).

Los ligandos moduladores alostéricos presentan muchas ventajas desde el punto de vista farmacológico (Khoury et al., 2014; Melancon et al., 2012). En primer lugar, potencialmente pueden lograr una mayor selectividad por subtipos específicos de GPCR. Por otro lado, aquellos que presenten ausencia de eficacia intrínseca, únicamente ejercerán sus efectos en presencia del ligando endógeno liberado; así, pueden afinar selectivamente las respuestas celulares en aquellos tejidos en que el ligando endógeno actué fisiológicamente, manteniendo las características temporales y espaciales de la señalización endógena. Además, la completa ocupación del sitio alostérico produce un efecto de saturación que, a su vez, limita el efecto del ligando alostérico sobre la función del ligando ortostérico, protegiendo ante una potencial sobredosis del fármaco (Wootten et al., 2013).

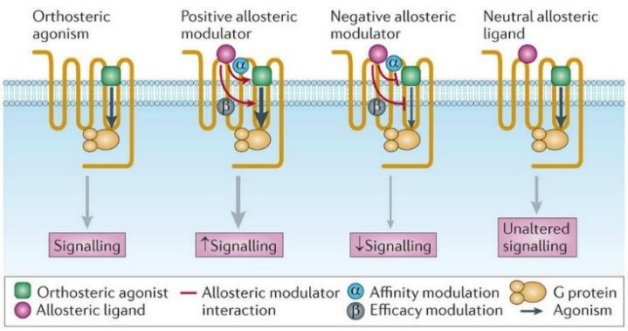


Figura 13. Posibles modulaciones alostéricas sobre ligandos ortostéricos. (Extraído de Wootten et al., 2013)

En los complejos oligoméricos de GPCRs, también puede darse el fenómeno del alosterismo entre diferentes protómeros del mismo complejo u otras proteínas de unión. Existen 3 tipos de alosterismo en GPCRs: *clásico*, en el que la diana del modulador alostérico es un ligando distinto que se une al lugar ortostérico; *lateral*, en el que la diana de la modulación es un componente del plano de la membrana, y *citosólico*, de manera que la diana del ligando alostérico se sitúa en el interior celular (Kenakin and Miller, 2010).

Con respecto al alosterismo lateral en oligómeros de GPCRs, es posible tanto una modulación por la activación de un protómero sobre el otro protómero, como por la mera interacción con otro protómero igual (homodímero) o diferente (heterodímero) (Ferré et al., 2016; Smith and Milligan, 2010). Tanto el alosterismo clásico como el citosólico pueden dar lugar al fenómeno de selectividad funcional o señalización *biased*, es decir, promover la capacidad de un ligando ortostérico de inducir de manera selectiva una vía de señalización específica, ampliando así el campo de aplicaciones del *biased* farmacológico (Reiter et al., 2012) (véase apartado 1.1.4. Actividad constitutiva y activación por ligandos de los GPCRs).

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

1.2.3 Técnicas para identificar oligómeros de GPCRs

Como se ha comentado previamente, las primeras evidencias de la existencia de interacciones moleculares entre GPCRs se obtuvieron mediante estudios farmacológicos y experimentos de unión a radioligandos, así como mediante el uso de receptores mutantes (Maggio et al., 1993). Una de las técnicas más utilizadas para estudiar la dimerización de GPCRs ha sido la co-inmunoprecipitación (CoIP), técnica bioquímica en la que las proteínas de interés se aíslan mediante la precipitación de un receptor con anticuerpos específicos mientras la existencia de interacciones se detecta con anticuerpos específicos contra otros receptores del complejo. Sin embargo, mediante esta técnica se establecen evidencias de interacciones directas proteína-proteína que pueden resultar ambiguas, teniendo en cuenta que requiere de la previa solubilización de las membranas mediante detergentes, lo que puede provocar la observación de falsos positivos por la formación de agregados proteicos debido a la naturaleza hidrofóbica de los receptores.

La gran aportación de datos que respaldan la existencia de homómeros y heterómeros entre GPCRs en células intactas se debe principalmente a la aplicación de técnicas biofísicas, como las técnicas de transferencia de energía por resonancia. En 1948, Theodor Förster describió el principio básico de la transferencia de energía por resonancia, que consiste en la transferencia de energía no radiante desde un cromóforo excitado conocido como dador hacia una molécula aceptora cercana (Förster, 1948). La aplicación de este principio a los GPCRs permitió el estudio de interacciones entre receptores en células vivas, en las que se co-expresan las proteínas a analizar: uno de los protómeros del potencial complejo proteico se fusiona con una proteína dadora fluorescente o luminiscente, mientras que el otro protómero se fusiona con una proteína aceptora fluorescente. Si la energía transmitida es fluorescente, la técnica recibe el nombre de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) mientras que si la energía transmitida es bioluminiscente, se trata de *Bioluminiscence Resonance Energy Transfer* (BRET). Para que se produzca la transferencia de energía es necesario que tanto dador como aceptor estén a una distancia inferior a 100 Å o 10 nm, distancia a la cual se encuentran la mayor parte de complejos multiproteicos presentes en una célula (Ali and Imperiali, 2005; Sheng and Hoogenraad, 2007), así como que exista un solapamiento entre el espectro de emisión de la proteína dadora y el espectro de excitación de la aceptora. Así, la transferencia de energía será más eficaz cuanto mayor superposición exista entre los espectros de excitación-emisión de donador y aceptor y cuanto más favorable sea la orientación espacial relativa de los fluoróforos, ya que la eficiencia del BRET/FRET decae con la sexta potencia de la distancia entre fluoróforos (radio de Förster). Los primeros estudios de FRET y BRET fueron descritos para proteínas G en amebas (Janetopoulos et al., 2001) y posteriormente se aplicaron al estudio de GPCRs y proteínas G en células de mamífero.

En la técnica de FRET se requiere la fusión de las proteínas de estudio a diferentes variantes de la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*), siendo las más comúnmente estudiadas la variante GFP^2 como dadora y la variante YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) como aceptora. Cuando se excita de manera extrínseca la proteína GFP^2 a 400 nm, ésta emite fluorescencia con un pico de emisión a 510 nm, solapándose con el espectro de excitación de la proteína aceptora YFP; si ambas proteínas están suficientemente próximas en el espacio, se producirá la transferencia de energía que permitirá la excitación y consecuente emisión de la proteína YFP a 530 nm (Figura 14). La saturación de la transferencia observada para proteínas formando oligómeros específicos permite diferenciar la señal de FRET no específica debida a colisiones al azar por sobreexpresión de las proteínas fluorescentes, problema común en las técnicas basadas en el principio transferencia de energía por resonancia (Piston and Kremers, 2007). Por otra parte, el ajuste *linear unmixing* (Zimmermann, 2005) permite discriminar claramente diferentes características espectrales dentro de una muestra cuando se utilizan

fluoróforos distintos cuyos espectros se solapan parcialmente, problema inherente a técnicas como la de FRET. El ajuste de Zimmerman es un método que asume que la señal total detectada en cada canal puede ser expresada como una combinación linear de los fluoróforos que contribuyen, de manera que permite analizar contribuciones mezcladas en un solo píxel. Es decir, en lugar de medir la intensidad (espectral), mediante este ajuste se mide el decaimiento de fluorescencia en el tiempo y la contribución de cada fluoróforo a cada canal espectral sucesivo.

En la técnica de BRET se precisa la fusión de una de las proteínas de estudio con una enzima luminiscente que actúa de proteína dadora, mientras la otra se fusiona con una proteína fluorescente aceptora. Se han descrito dos variantes de la técnica de BRET, el BRET[1], en que la proteína dadora es la enzima *Renilla reniformis* luciferasa (Rluc) o una variante de ésta, capaz de catalizar la oxidación del substrato luminiscente *coelenterazine H* en presencia de oxígeno emitiendo luz a 485 nm que será transferida a la proteína YFP, y el BRET[2], en el que la enzima Rluc oxida un substrato diferente, el *DeepBlueC*, que emite a 400 nm excitando a la proteína GFP[2] (Figura 15). En la última década, la técnica de BRET se ha utilizado para investigar múltiples interacciones proteína-proteína, no sólo en el campo de los GPCRs (Ayoub and Pfleger, 2010; Ferré et al., 2010a) sino que también ha sido aplicada al estudio de procesos celulares dinámicos, ya sea previo tratamiento farmacológico o mediante el desarrollo de biosensores para diversas vías de señalización (Salahpour et al., 2012).

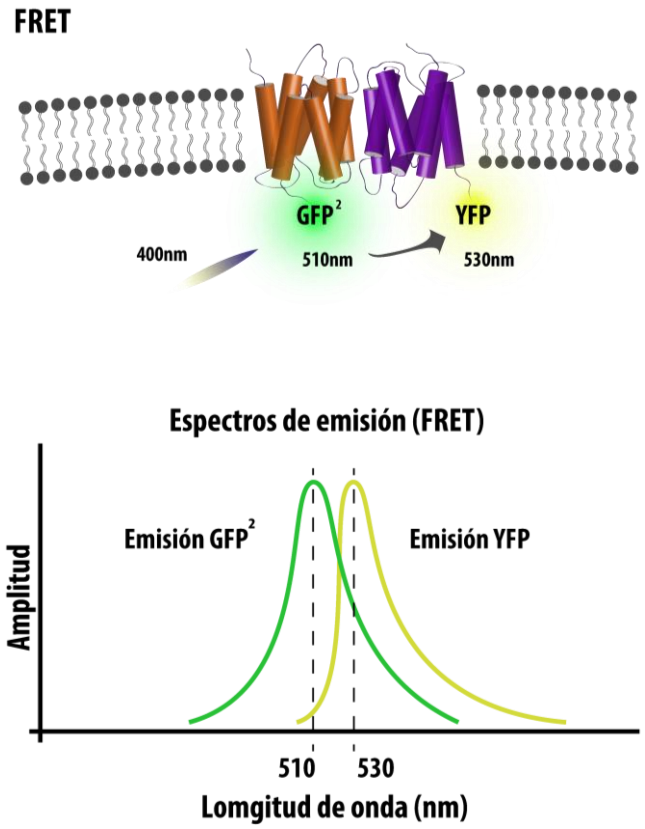


Figura 14. Representación esquemática del fenómeno de FRET y sus correspondientes espectros de emisión.

Existen diferencias destacables entre las técnicas de BRET y FRET en cuanto a su aplicabilidad. Mediante la técnica de BRET no es posible determinar la localización subcelular del fenómeno biológico estudiado, mientras que sí es posible hacerlo mediante FRET por microscopía; además, a diferencia de la técnica de FRET, la técnica de BRET no requiere una estimulación externa para iniciar la transferencia de energía, de manera que se evita tanto el ruido de fondo debido a la estimulación directa como el fenómeno de fotoblanqueo, además del posible solapamiento parcial de los espectros de emisión de las dos proteínas fluorescentes. Estos inconvenientes también son evitados mediante una nueva evolución de la técnica de FRET, el FRET con resolución temporal (TR-FRET) (Pfleger and Eidne, 2005). Dicha técnica requiere de un fluoróforo de vida larga (300-1000 µs) como el *Eu3+-cryptate* (Mathis, 1995), que permite la excitación prolongada de la proteína aceptora fluorescente roja en ausencia de un estímulo externo continuado, disminuyendo el ruido de fondo y el posible solapamiento de los espectros de emisión. La técnica de TR-FRET ha permitido validar la existencia de múltiples oligómeros de GPCRs en la superficie de células intactas mediante el uso de anticuerpos específicos marcados para los receptores diana, que a su vez constituyen su principal limitación, y mediante ligandos marcados que permiten la realización de experimentos de unión sin necesidad de radioactividad (Maurel et al., 2008).

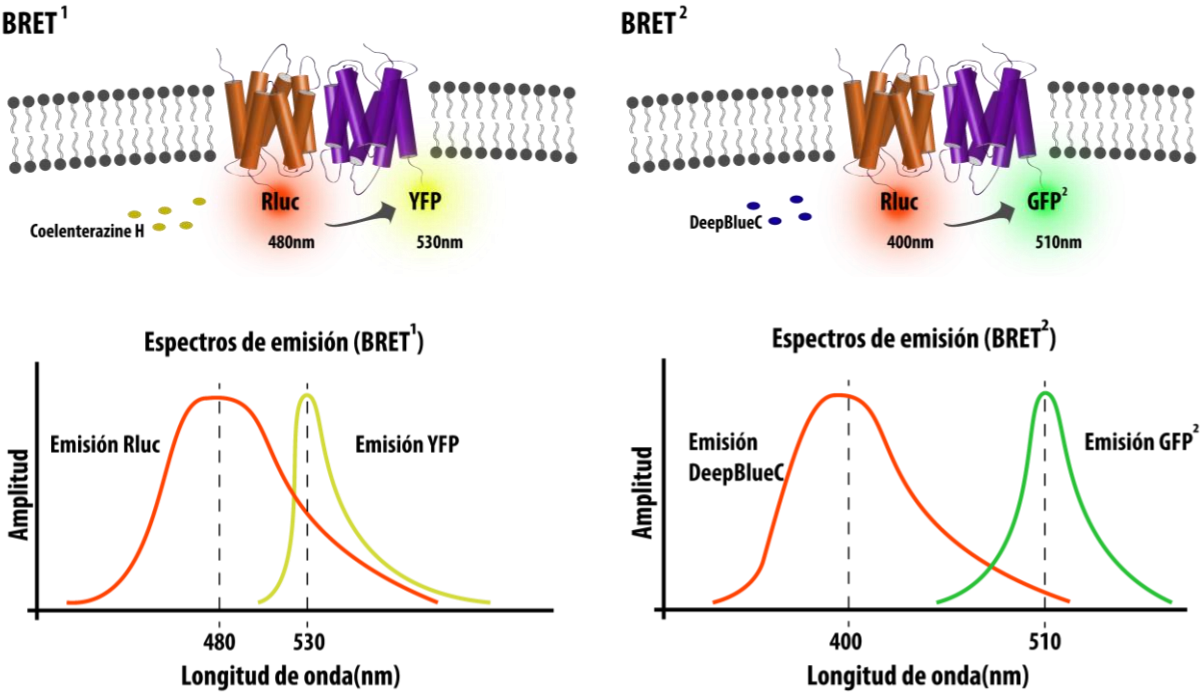


Figura 15. Representación esquemática de los fenómenos de BRET¹ y BRET² y sus correspondientes espectros de emisión.

Otras técnicas que también permiten la detección directa de interacciones proteína-proteína en células vivas son la complementación bimolecular fluorescente (BiFC) y luminiscente (BiLC) (Hu et al., 2002), que consisten en la reconstitución funcional de proteínas activas, típicamente enzimas o fluoróforos, a partir de dos fragmentos inactivos fusionados a las proteínas de interés, si ambas se encuentran suficientemente próximas (Figura 16). Una ventaja respecto a las técnicas de transferencia de energía por resonancia es la producción de una señal fluorescente *de novo* en lugar de cambios en una fluorescencia existente, mientras que como limitación presenta la posible asociación espontánea de los fragmentos bajo determinadas circunstancias.

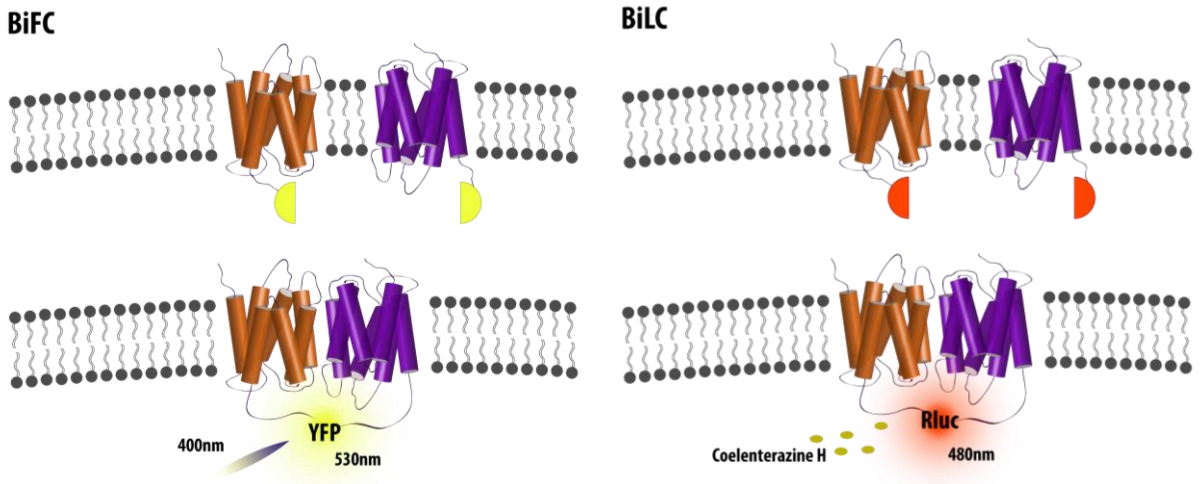


Figura 16. Representación esquemática del fenómeno de BiFC y BiLC.

Se combinaron las técnicas de BRET y FRET para poder determinar la formación de oligómeros de orden superior. Por un lado, la técnica de transferencia de energía por resonancia secuencial (SRET) se basa en un primer proceso de BRET, en el que la emisión bioluminiscente por parte

de la enzima Rluc fusionada al primer protómero es capaz de excitar a la proteína GFP^2 fusionada al segundo protómero, y la emisión de ésta es capaz de activar el segundo proceso de FRET, transfiriendo energía a la proteína YFP fusionada al tercer protómero del complejo (Figura 17). Por otro lado, también es posible combinar de manera secuencial técnicas de BiFC/BiLC con técnicas de RET, permitiendo la detección de estructuras triméricas y tetraméricas.

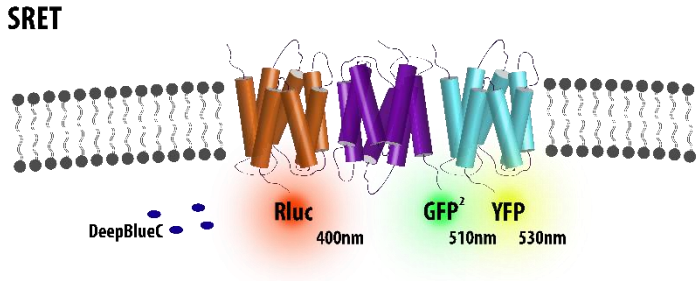


Figura 17. Representación esquemática del fenómeno de SRET.

La principal desventaja asociada a estas técnicas biofísicas reside en su difícil implementación en tejidos nativos, por la imposible realización de una transfección de cDNA y la costosa modificación genética del individuo, de manera que los datos reportados se limitan a sistemas de expresión heteróloga.

Las primeras evidencias de la oligomerización de GPCRs en sistemas fisiológicos se obtuvieron mediante la realización de experimentos de microscopía de fuerza atómica en membranas de discos nativos procedentes de ratón, que mostraron la reorganización del GPCR rodopsina en complejos diméricos paracristalinos (Fotiadis et al., 2003). A diferencia de los sistemas de expresión heteróloga, en que los receptores marcados con un epítopo o bien fusionados a proteínas fluorescentes son fácilmente expresados, el nivel de expresión de los receptores en tejido nativo generalmente es difícil de modificar y/o detectar. En la última década se han desarrollado aproximaciones que permiten abordar este inconveniente y han aportado resultados prometedores en tejido nativo, como el uso de ligandos marcados que permiten la aplicación del TR-FRET (Albizu et al., 2010) o el desarrollo de anticuerpos específicos de heterómero (Gomes et al., 2013), aunque requieren ser altamente específicos y proporcionar una señal fiable, lo que suele requerir a su vez altos niveles de oligómeros de GPCRs.

Otra técnica también basada en el uso de anticuerpos es el ensayo de ligación por proximidad (PLA), en que dos anticuerpos primarios distintos que reconocen los dos protómeros del heterómero son a su vez reconocidos por dos anticuerpos secundarios específicos de especie y conjugados a oligonucleótidos complementarios (sondas *minus* y *plus*), de manera que, si los receptores están lo suficientemente cerca, las cadenas de DNA podrán ser ligadas, amplificadas y visualizadas con una sonda fluorescente (Weibrecht et al., 2010). La máxima distancia entre anticuerpos secundarios para este ensayo es de unos 16 nm, ligeramente superior a la considerada para los ensayos de transferencia de energía entre fluoróforos (5-10 nm) (Söderberg et al., 2006), mientras que la distancia máxima entre los receptores será de 10 a 30 nm si se utilizan anticuerpos primarios conjugados directamente con las sondas *minus* y *plus*, aumentando a 40 nm si se usan anticuerpos secundarios conjugados a estas sondas. Aunque la técnica de PLA no demuestra la heteromerización de GPCRs, permite la validación *ex vivo* de la proximidad molecular entre dos GPCRs, estableciendo un marco en que la heteromerización puede suceder *in vivo*.

También mediante técnicas de microscopía, en este caso experimentos en que se mide la reflectancia total interna de una molécula única por microscopía de fluorescencia (TIR-FM), se

monitorizó la posición individual del receptor muscarínico de acetilcolina M1 mediante ligandos fluorescentes, revelando la formación y disociación de los dímeros en una escala de segundos (Hern et al., 2010; Kasai et al., 2011). Además, la combinación de esta técnica con la tecnología SNAP-tag (método basado en la unión irreversible de la proteína reparadora del DNA O6-alquilguanina-DNA alquiltransferasa [AGT] con derivados de la O6-benzilguanina [BG], marcados selectivamente con fluoróforos) permite el marcaje directo de GPCRs con fluoróforos orgánicos con objeto de monitorizar la dinámica de los protómeros individuales a nivel de superficie celular en células vivas transfectadas (Hänselmann and Herten, 2017; Kolberg et al., 2013). El estudio realizado con distintas densidades de receptores β_1 y β_2-adrenérgicos permitió a Calebiro y colaboradores la visualización de la formación de dímeros, trímeros y tetrámeros de manera que, a densidades comparables con la expresión de estos receptores en tejidos nativos, las especies predominantes son los dímeros y los oligómeros de orden superior (Calebiro et al., 2013). La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), que mide las fluctuaciones en la intensidad de la fluorescencia a partir de proteínas individuales marcadas (Chen et al., 2003; Scarselli et al., 2016), ha permitido la detección de la formación de clústeres de oligómeros de GPCRs, además de la demostración de la expresión predominante en forma de homodímeros de muchos GPCRs. Por otro lado, la espectrometría cuantitativa por FRET, que permite controlar la expresión de las especies donadoras, ha permitido demostrar que el receptor muscarínico M3 existe como dímero estable y que una gran fracción interacciona de manera dinámica para formar tetrámeros con una organización específica en forma romboidal (Patowary et al., 2013). Es preciso destacar que cada receptor presenta su propia estequiometría y que parece existir un proceso de transición dinámico entre los diferentes complejos.

Una estrategia indirecta para la detección de complejos de GPCRs consiste en la identificación de una propiedad bioquímica (huella bioquímica) del oligómero (Ferré et al., 2009). Para ser considerada como tal, esta característica bioquímica debe poder ser alterada mediante el uso de herramientas químicas o moleculares que interfieran o desestabilicen la estructura oligomérica del complejo, como la introducción de mutaciones o el uso de péptidos que compitan por la interfaz del oligómero (Ferré et al., 2014).

Por lo tanto, para la correcta identificación de oligómeros de GPCRs en tejido nativo son necesarias múltiples aproximaciones complementarias y que sean críticamente evaluadas y validadas también en sistemas de expresión heteróloga, especialmente cuando se buscan propiedades bioquímicas específicas del oligómero (Kent et al., 2007; Szidonya et al., 2008).

1.2.4 Relevancia funcional de la oligomerización de GPCRs

Como se ha comentado anteriormente, la formación de complejos de GPCRs, especialmente en el caso de la heteromerización, proporciona nuevas entidades funcionales con propiedades bioquímicas distintas con respecto a los componentes individuales del oligómero. Un receptor en el oligómero puede mostrar características que simplemente dependan de la presencia de otro protómero en el complejo, o bien de la co-activación de los dos (o más) componentes del heterómero (Ferré et al., 2007). La oligomerización de GPCRs es, en sí misma, una forma de modulación alostérica y constituye un orden superior de regulación de la señalización mediada por estos receptores.

Existe una notable dificultad para establecer la relevancia funcional de este fenómeno debido a que muchas de las evidencias que lo demuestran se han obtenido en sistemas de expresión heteróloga, en los que pueden ser co-expresados otros receptores no presentes *in vivo* en la misma célula, además de presentar elevados niveles de los receptores a estudiar, hecho que puede llevar a la observación de interacciones no fisiológicas. Aun así, existen múltiples evidencias que

llevan a la consideración de la oligomerización de GPCRs como un fenómeno común en la biología de estos receptores y se han descrito numerosas implicaciones funcionales (Farran, 2017; Milligan, 2009; Panetta and Greenwood, 2008).

La unión de ligandos puede modular la asociación o la separación de los componentes del oligómero, así como influir en las características de unión de otro ligando al segundo protómero del complejo, propiedad que otorga al oligómero un nuevo perfil farmacológico que puede resultar de utilidad para detectar estos complejos en tejido nativo. Este es el caso, por ejemplo, de los heterómeros de δOR y μOR, en los que la afinidad para múltiples ligandos endógenos y exógenos es diferente a la que presentan para los receptores expresados por separado (George et al., 2000). En algunos casos, la estimulación de un receptor disminuye la afinidad del otro receptor del complejo, mientras que otras veces puede aumentarla; además, esta interacción puede ser unidireccional o, generalmente, recíproca. Otra de las propiedades afectadas por la oligomerización es la difusión lateral en la membrana plasmática, como es el caso para los receptores D_1 de dopamina y el receptor glutamatérgico ionotrópico de N-metil-D-aspartato (NMDAR), en que la activación del canal iónico NMDAR promueve la localización específica del D_1R en las espinas dendríticas (Scott et al., 2006). La formación de dímeros para conseguir una adecuada localización subcelular es también un fenómeno muy común entre receptores, ya sea para conseguir llegar a la membrana plasmática o bien durante el proceso de internalización. Por lo que respecta a la expresión en la membrana celular, la dimerización entre GPCRs es en muchos casos necesaria para alcanzarla y en otros es precisamente un mecanismo para la retención del receptor en el RE, como sucede con el *splicing* alternativo del gen del receptor de dopamina D_3, en que proteínas truncadas ($D_{3nf}R$) dimerizan con el receptor funcional e impiden su llegada a la membrana plasmática, ejerciendo así como dominantes negativos y regulando la señalización de D_3R (Karpa et al., 2000). La heteromerización también puede influir en el proceso de internalización, como así demuestra un estudio de los heterómeros entre δOR y μOR: la activación del δOR induce la co-internalización del μOR, limitando de manera importante la analgesia producida por la morfina y asociada a la activación de los μORs (He et al., 2011). Otra importante característica funcional de la interacción entre GPCRs consiste en que un receptor puede alterar el acoplamiento a proteínas efectoras o bien regular la potencia de otro receptor en el complejo, lo que comporta que existan efectos específicos de tejido dependiendo de los receptores expresados. Un claro ejemplo es el del heterómero de receptores A_{2A}-CB_1, en que CB_1R no se acopla a proteínas Gαi a no ser que el $A_{2A}R$ sea también co-activado (Carriba et al., 2007) o el del heterómero CB_1-D_2, en que la activación conjunta o simplemente la co-expresión de ambos receptores en células estriatales en cultivo cambia el acoplamiento de proteína Gαi, en los receptores individuales, a proteína Gαs (Jarrahian et al., 2004). Por último, se ha postulado la posibilidad de que muchos de los GPCRs huérfanos no tengan un ligando endógeno, sino que dimerizarían con otros receptores y regularían, de una forma independiente de ligando, a dichos GPCRs.

Los multímeros u oligómeros de orden superior constituyen una muestra más de la potencial expansión de la diversificación farmacológica y funcional asociada a la formación de complejos macromoleculares. En ellos se pueden observar los mismos fenómenos descritos para los complejos diméricos pero con un grado superior de complejidad, teniendo en cuenta que los cambios en el perfil farmacológico de un receptor dependen tanto de la presencia como de la activación de los demás receptores del complejo. Los cambios en las respuestas asociadas a las vías de señalización dependen de los receptores del complejo, el grado de activación y la naturaleza de las proteínas G expresadas en el plano molecular (Terrillon and Bouvier, 2004).

Tal como se ha descrito, en múltiples procesos la oligomerización de GPCRs tiene una gran importancia funcional. Por ello, actualmente se centran muchos esfuerzos en el estudio de la selectividad funcional y en la descripción de ligandos agonistas y antagonistas *biased* (Gomes et

al., 2016), así como en la exploración de distintas aproximaciones con la finalidad de desarrollar ligandos dirigidos de manera selectiva hacia heterómeros de receptores, ya sean péptidos capaces de interferir en la oligomerización (He et al., 2011), compuestos dirigidos a uno de los receptores del complejo (Waldhoer et al., 2005), o bien ligandos bivalentes que puedan interaccionar simultáneamente y específicamente con ambos receptores de la entidad (Daniels et al., 2005; Hiller et al., 2013).

1.3 Sistema dopaminérgico

1.3.1 La dopamina como neurotransmisor

Entre los años 1930 y 1960 existió un fuerte debate científico acerca de si la comunicación a través de las sinapsis entre células nerviosas era de naturaleza eléctrica o química. La dopamina fue identificada en 1959 por Arvid Carlsson como un potencial neurotransmisor cerebral (Carlsson, A., 1959), idea que en aquel entonces resultó ser ampliamente rechazada debido al convencimiento mayoritario en la comunidad científica de que la transmisión sináptica en el SNC era eléctrica, pero que 41 años después le fue reconocido con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina junto a Eric Kandel y Paul Greengard, quien describió los mecanismos de señalización celulares inducidos por la activación de receptores dopaminérgicos (revisado en Greengard, 2001). Actualmente, es sabido y aceptado que aproximadamente el 99% de las sinapsis cerebrales son de naturaleza química, diferenciándose entre sinapsis rápidas y lentas. Las sinapsis rápidas ocurren en menos de una fracción 1/1.000 de segundo y son promovidas por la activación de receptores que son a su vez canales iónicos; aproximadamente la mitad de estas sinapsis son excitatorias, permitiendo la entrada de iones Na^+ y causando despolarización en la célula postsináptica, y la otra mitad inhibitorias, favoreciendo la entrada de iones Cl^- y causando hiperpolarización. Las sinapsis lentas (en las que participan los GPCRs, entre otros receptores), en cambio, ocurren en periodos que van desde décimas de segundo a minutos y son enormemente más complejas que las sinapsis rápidas. Hasta la fecha, se han identificado al menos 100 compuestos considerados como neurotransmisores cerebrales, los cuales pueden agruparse en tres clases en función de su naturaleza química: aminas biogénicas, péptidos y aminoácidos.

La dopamina es una amina biogénica que representa el 80% del contenido total de catecolaminas del cerebro y controla una gran variedad de funciones como la modulación de la actividad sensorial, la actividad motora, la actividad endocrina, el aprendizaje, la memoria, la emotividad, la afectividad, la recompensa y la motivación. Además, desarrolla múltiples papeles en el sistema nervioso periférico como modulador de la función cardiovascular, secreción hormonal, tono vascular, función renal y motilidad gastrointestinal (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998). En la década de los 60's se generaron las primeras evidencias del vínculo existente entre alteraciones en la transmisión dopaminérgica y la enfermedad de Parkinson (PD), la cual se manifiesta con una disminución dramática del contenido de dopamina en los núcleos caudado y putamen por la pérdida de neuronas en la sustancia negra (SN), lo que llevó al uso de la levodopa (L-DOPA), el precursor metabólico de la dopamina, como una terapia sustitutiva eficiente para aliviar los síntomas de la enfermedad (Yahr et al., 1969). A lo largo de las últimas décadas, el sistema dopaminérgico ha sido foco de muchísimos estudios neurobiológicos debido a su implicación también en desórdenes bipolares, depresión, esquizofrenia, enfermedad de Huntington (HD), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD), enfermedad de Alzheimer (AD), síndrome de Tourette, así como en la hiperprolactinemia y los trastornos de adicción (Beaulieu et al., 2015; Dalley and Everitt, 2009; Iversen and Iversen, 2007).

Al no ser capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BBB), la biosíntesis de la dopamina se produce en el citosol de las terminales nerviosas dopaminérgicas a partir del aminoácido L-tirosina, existiendo precisos mecanismos reguladores de su síntesis y liberación (Daubner et al., 2011; Sulzer et al., 2016) (Figura 18). La L-tirosina se produce en el hígado a partir de fenilalanina y es captada por las células mediante un mecanismo de transporte activo, donde a través de una serie de reacciones es convertida a dopamina. La primera de ellas la lleva a cabo la tirosina hidroxilasa (TH), enzima expresada en el citoplasma de neuronas catecolaminérgicas, que convierte la L-tirosina en L-DOPA y representa el factor limitante en la síntesis de catecolaminas, por lo que está sujeta a regulación, resultando inhibida por elevados niveles de catecolaminas. La variación en los niveles de tirosina no conseguirá afectar a la velocidad de síntesis de la dopamina, ya que la TH se encuentra normalmente saturada. Una vez formada, la L-DOPA es rápidamente convertida a dopamina por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) y transferida a vesículas mediante el transportador VMAT2 (*vesicular monoamine transporter 2*) (Ayano, 2016; Musacchio, 1975). La liberación de la dopamina al espacio sináptico requiere la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que promueven la fusión de vesículas repletas de dopamina con la membrana plasmática. Allí se unirán a sus receptores, localizados pre- y postsinápticamente (Sulzer et al., 2016). La señalización dopaminérgica, que puede presentar un patrón de liberación tónico con pequeñas y lentas descargas para mantener una cierta actividad basal, o bien un patrón fásico mediante rápidos pulsos de descarga, finalizará con la eliminación de la dopamina del espacio intersináptico. Este proceso será llevado a cabo mediante su catabolismo por parte de enzimas extraneuronales y mediante su recaptación por las propias terminales nerviosas a través de los transportadores específicos DAT (*dopamine transporter)*, los cuales permiten, además, su reciclaje (Sotnikova et al., 2006). Una vez dentro de la célula, la dopamina se acumula y concentra de nuevo en vesículas gracias al VMAT2. Los receptores presinápticos son principalmente autorreceptores y constituyen otro de los mecanismos responsables de la regulación de la transmisión dopaminérgica, promoviendo la inhibición de la liberación continuada de dopamina (Zhang and Sulzer, 2012).

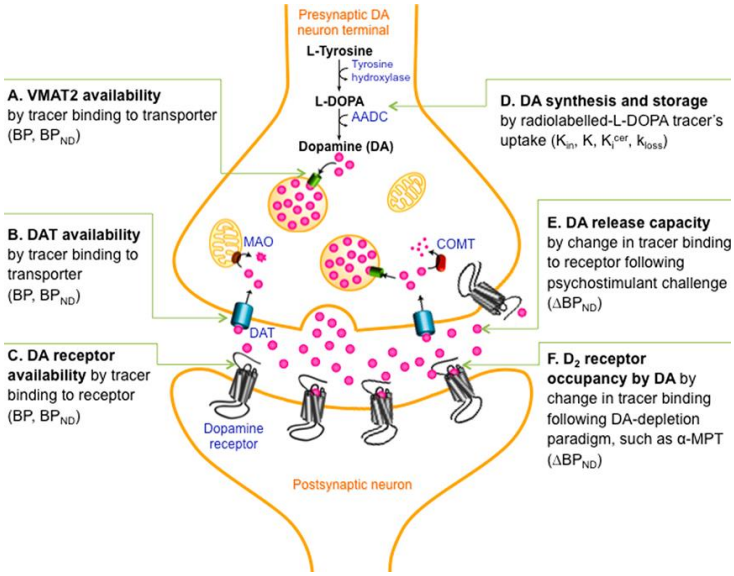


Figura 18. Representación esquemática de los mecanismos de síntesis y liberación de dopamina, así como los métodos de imagen existentes para su estudio *in vivo*. (Extraído de Weinstein et al., 2017).

1.3.2 Receptores de dopamina: estructura, clasificación y expresión diferencial.

Las primeras evidencias de la existencia de receptores dopaminérgicos fueron reportadas en 1972 por el grupo de Greengard, mediante estudios bioquímicos que mostraban que la dopamina era capaz de estimular la formación de cAMP (Kebabian and Greengard, 1971). En 1978, los receptores de dopamina se clasificaron en dos grupos, los receptores activadores de la adenilato ciclasa (AC) y los inhibidores de la AC (Spano et al., 1978; Kebabian and Calne, 1979), pero no fue hasta 1993, mediante la técnica de clonaje, que se aislaron 5 receptores distintos para la dopamina (Gingrich and Caron, 1993). En función de sus propiedades bioquímicas y

farmacológicas, estos receptores pertenecientes a la clase A de GPCRs han sido clasificados en dos subfamilias: los receptores D_1-*like*, que comprende los receptores D_1 y D_5, y los receptores D_2-*like*, que comprende los receptores D_2, D_3 y D_4 (Figura 19). Los receptores de la subfamilia D_1-*like* promueven incrementos de cAMP a través de proteínas Gαs/olf que estimulan la AC y se localizan principalmente en los terminales postsinápticos, aunque también han sido detectados presinápticamente en corteza prefrontal (Paspalas and Goldman-Rakic, 2005) e hipocampo (Miklosi et al., 2017). Los receptores de la subfamilia D_2-*like* inhiben la AC por acoplamiento a proteínas Gi/o, además de activar canales de K^+ y disminuir la entrada de Ca^{+2} a través de canales dependientes de voltaje, y se localizan en terminales tanto presinápticos como postsinápticos (Galvan et al., 2014). Estudios estructurales, farmacológicos y bioquímicos sugieren que cada receptor presenta características únicas, incluida la afinidad por la dopamina y su especificidad para acoplarse a proteínas G, y muestra una distribución neuronal particular (Missale et al., 2010).

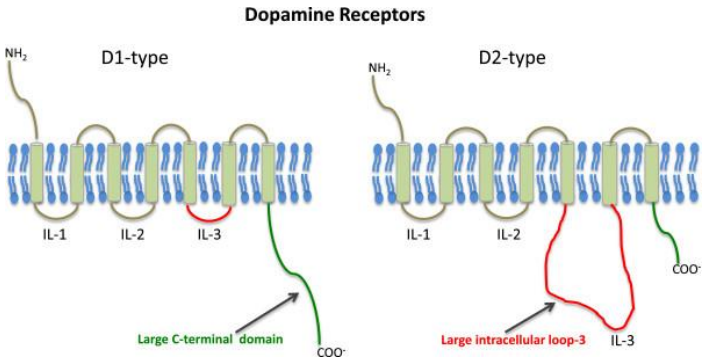


Figura 19. Representación esquemática de las dos subfamilias de receptores de dopamina (Extraído de Pandey et al., 2013).

La organización genómica de los receptores de dopamina sugiere que provienen de dos familias génicas que difieren principalmente en la presencia o no de intrones en su secuencia codificante (Gingrich and Caron, 1993; Le Foll et al., 2009): los receptores D_1-*like* no contienen intrones, característica que comparten con la mayoría de GPCR; en cambio, y por analogía con el gen de la rodopsina, los genes que codifican para los receptores D_2-*like* están interrumpidos por intrones (Vallone et al., 2000). La presencia de intrones en la región codificante de los receptores D_2-*like* permite la generación de variantes de estos receptores, como es el caso de los receptores D_2 y D_3. En el caso del D_2R, un solo gen codifica para dos isoformas llamadas $D_{2S}R$ (*short*) y $D_{2L}R$ (*long*); el salto en el exón 6 genera un mRNA que codificará para un receptor ($D_{2S}R$) con 29 aminoácidos menos en el tercer bucle intracelular (Gorwood et al., 2012). Esta diferencia de 29 aminoácidos les confiere ciertas características diferenciales, como su localización, expresándose el receptor D_{2S} principalmente a nivel presináptico y el D_{2L} a nivel postsináptico. Pese a que tanto $D_{2S}R$ como $D_{2L}R$ tienen la misma capacidad de unir ligando, el nivel de expresión de la isoforma larga es diez veces mayor que el de la isoforma corta. También difieren en la capacidad de acoplarse a proteína G, de manera que la isoforma $D_{2L}R$ es más afín a Gi y $D_{2S}R$ tanto a Gi como a Go, hecho que explicaría la regulación de diferentes respuestas biológicas por la diversidad de señal generada. En el caso del D_3R, receptor que presenta la mayor afinidad por la dopamina, existen siete isoformas también generadas por *splicing* alternativo, siendo tan solo dos de ellas funcionales, conteniendo 33 aminoácidos menos la más corta ($D_{3S}R$) como resultado del salto del exón 6, y además con 81 aminoácidos distintos debido a la generación de un salto en la pauta de lectura (Richtand et al., 2010). Como se comentó anteriormente, una de las isoformas no funcionales, la D_3nfR, no es capaz de unir dopamina pero sí de dimerizar con la isoforma larga (D_3R) y consecuentemente retenerla en compartimentos intracelulares, ejerciendo su regulación por dominancia negativa (Karpa et al., 2000). El gen del receptor D_4R contiene cuatro exones y un número de polimorfismos variable en la secuencia codificante. El más extendido es el que se encuentra en el tercer exón, cuya región codifica para el tercer bucle citoplasmático y consiste en un número variable de repeticiones en tándem, es decir, unas secuencias de 48 bp que codifican para diferentes polipéptidos formados por 16 aminoácidos. Éstos pueden formar combinaciones

distintas que pueden presentar de 2 a 11 repeticiones dando así el nombre al subtipo de receptor de $D_{4.2}R$ a $D_{4.11}R$ y proporcionando un tamaño variable a cada polimorfismo (Oak et al., 2000; Van Tol et al., 1992). La frecuencia de los diferentes polimorfismos varía de forma considerable en función de la población y la etnia; a pesar de ello, estudios genéticos de población sobre la diversidad alélica demostraron que los polimorfismos $D_{4.2}R$, $D_{4.4}R$ y $D_{4.7}R$ son los más prevalentes, presentándose en el 90% de la población (Ding et al., 2002; Kidd et al., 2014)

Las dos subfamilias de receptores dopaminérgicos contienen, en su CTD, sitios de fosforilación y palmitoilación implicados en la desensibilización dependiente de ligando y en la formación de un cuarto pseudo-bucle intracelular, respectivamente, aunque presentan peculiaridades estructurales diferenciales: los receptores D_1-*like* tienen un CTD unas siete veces más largo que el de los D_2-*like*, mientras que estos últimos tienen el tercer bucle intracelular muy largo, característica común en muchos receptores acoplados a proteína Gi (Missale et al., 1998). Además, los ligandos dopaminérgicos permiten discriminar fácilmente entre las dos subfamilias debido a sus diferencias estructurales, mientras que no permiten hacerlo entre miembros de la misma subfamilia (Vallone et al., 2000). Entre los receptores D_1-*like* existe una homología de secuencia del orden del 80%, mientras que entre los de la subfamilia D_2-*like* es del 75% entre los receptores D_2R y D_3R y de un 53% entre los receptores D_2R y D_4R. Por el contrario, la homología entre los receptores D_1-*like* y D_2-*like* es solo del 42-46%, y las regiones que presentan una más elevada homología se encuentran entre los dominios transmembrana y en aquellos residuos clave para la unión de catecolaminas (Ayano, 2016). Recientemente, mediante estudios filogenéticos se ha demostrado que los receptores D_1-*like* y D_2-*like* no están filogenéticamente más relacionados entre ellos de lo que lo están con otros receptores de monoaminas (Callier et al., 2003), hecho que sugiere que la capacidad de unir dopamina compartida por los dos tipos de receptores podría haber sido adquirida independientemente por convergencia a lo largo de la evolución (Yamamoto et al., 2013a). Es importante destacar, además, que la especificidad de los receptores por sus ligandos endógenos no es muy estricta entre los sistemas de monoaminas. De hecho, se ha reportado que la dopamina es capaz de unirse a los α_2Rs en aves y mamíferos (Cornil and Ball, 2008) y que la noradrenalina hace lo propio con los receptores D_2-*like* (Sánchez-Soto et al., 2016). Esta laxitud en la especificidad ligando-receptor confiere cierta flexibilidad, la cual debe haber favorecido el reclutamiento oportunista de genes de receptores de monoaminas en distintos sistemas fisiológicos durante la evolución (Yamamoto et al., 2013a).

Por lo que respecta a las propiedades farmacológicas de los receptores de dopamina, una diferencia remarcable entre los receptores D_1-*like* es la afinidad que presentan sus miembros por la dopamina, ya que el receptor D_5 tiene una afinidad 10 veces superior a la que muestra el receptor D_1. Las propiedades farmacológicas de los receptores D_2-*like* difieren entre sí aún más de lo que difieren entre sí los receptores de la subfamilia D_1-*like*. Así, las afinidades por muchos agonistas y antagonistas varían entre uno y dos órdenes de magnitud entre subtipos, incluyendo la dopamina, por la que el receptor D_3 tiene una afinidad 20 veces más alta que el receptor D_2. El receptor D_4 se caracteriza por ser el más diferenciado, presentando baja afinidad por la mayoría de antagonistas dopaminérgicos (Missale et al., 1998). Estas diferencias de afinidad que presentan los receptores de dopamina por su ligando endógeno permiten la activación preferencial de unos receptores u otros en función de la cantidad de dopamina liberada en la sinapsis.

La expresión diferencial de los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos refleja la diversidad funcional e importancia de la dopamina como neurotransmisor en el SNC y, para determinarla, se han empleado técnicas de unión a radioligandos, de hibridación *in situ* y marcajes con anticuerpos específicos. Así se ha demostrado que el D_1R es el más abundante y presenta mayor amplitud de distribución (Dearry et al., 1990), detectándose en diversas regiones del cerebro como neuronas GABAérgicas del núcleo estriado que coexpresan sustancia P, núcleo accumbens (NAc), tubérculo olfatorio, corteza frontal y temporal, amígdala, hipocampo e

hipotálamo. En la región reticulada de la sustancia negra (SNr), aunque se ha demostrado unión a ligandos específicos de D_1R, no se ha detectado su mRNA, lo que sugiere que el D_1R se sintetizaría en las neuronas estriatales que proyectan a la SN por la vía motora directa (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994). Otra evidencia de su localización presináptica la confiere su detección en fibras glutamatérgicas de la corteza prefrontal, hallazgo consistente con evidencias fisiológicas del papel de D_1R en la modulación de las neuronas implicadas en la memoria de trabajo (Paspalas and Goldman-Rakic, 2005). El receptor D_5R, en cambio, presenta una distribución más restringida a regiones como el tálamo, el núcleo lateral mamilar, el hipocampo, el estriado o la corteza prefrontal (Bergson et al., 1995; Centonze et al., 2003; Jackson and Westlind-Danielsson, 1994; Rivera et al., 2002), mostrando también implicación en la memoria de trabajo (Carr et al., 2017). Frecuentemente resulta difícil la diferenciación entre los receptores D_1R y D_5R debido a que son estimulados por los mismos ligandos y a que tienen una estructura molecular y farmacología similares. Mediante marcaje con anticuerpos específicos de células piramidales corticales se reveló que el receptor D_1R se concentra en las espinas dendríticas, mientras que el D_5R se localiza más en el tallo dendrítico (Bergson et al., 1995). Por otro lado, en el estriado, el D_5R se expresa en neuronas de proyección de la vía directa e indirecta con baja densidad, así como en todos los tipos de interneuronas, en este caso con una mayor densidad (Rivera et al., 2002). Esto va en concordancia con estudios en que se analizaron la implicación de estos dos receptores en la actividad motora y la plasticidad en sinapsis corticostriatales, en los que se observó que el D_1R y D_5R estarían implicados en la generación de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) respectivamente, y que en el control motor ocurriría una sinergia entre ambos cuando se expresan en la misma célula o bien tendrían una función opuesta cuando lo hacen en distintas poblaciones neuronales (Centonze et al., 2003). Es importante destacar que los receptores D_1-*like* han sido detectados también fuera del cerebro, expresándose ambos en regiones renales (Gildea et al., 2014) y adipocitos (Borcherding et al., 2011) y tan solo el D_5R en el células musculares vasculares (Natarajan et al., 2010).

En cuanto a los receptores D_2-*like*, el receptor D_2R se expresa predominantemente en el núcleo estriado, NAc, tubérculo olfatorio, glándula pituitaria e hipocampo. También se ha detectado su expresión en la región compacta de la sustancia negra (SNc) y en el área tegmental ventral (VTA) (Jackson and Westlind-Danielsson, 1994; Le Foll et al., 2009), regiones anatómicas que dan origen a fibras dopaminérgicas, indicando que los D_2R muestran aquí una localización presináptica, donde actúan como autorreceptores regulando la síntesis y liberación de dopamina (Ford, 2014; Mercuri et al., 1997). Fuera del cerebro, el D_2R se expresa también en la retina, riñón y sistema vascular (Picetti et al., 1997). El receptor D_3R sólo se expresa en el SNC y presenta una localización postsináptica en neuronas que expresan sustancia P y neurotensina y presináptica en ciertas terminales dopaminérgicas, como las regiones límbicas del NAc, estriado dorsal, SNc y corteza prefrontal, por lo que se ha sugerido también una posible función reguladora de la liberación de dopamina (Joseph et al., 2002; Le Foll et al., 2009). Además, en la corteza prefrontal los D_3Rs definen una población única de neuronas glutamatérgicas en las que prácticamente no se expresan ni D_1R ni D_2R, en las que se ha descrito la capacidad del D_3R para regular la generación de potenciales de acción de alta frecuencia mediante mecanismos no descritos para otros receptores dopaminérgicos (Clarkson et al., 2017). Por último, el receptor D_4R se expresa en interneuronas GABAérgicas tanto piramidales como no piramidales de la corteza frontal, hipocampo, bulbo olfatorio, amígdala y mesencéfalo (Le Foll et al., 2009; Missale et al., 1998). Tanto D_3R como D_4R se expresan mayoritariamente en regiones del sistema límbico y son de especial interés farmacológico por su alta afinidad por neurolépticos atípicos como la clozapina (Ayano, 2016).

Además de la señalización transmitida en la propia sinapsis, existe la llamada neurotransmisión por volumen, es decir, aquella promovida por la difusión del neurotransmisor hasta una región

no sináptica donde puede ser detectado. Los receptores D_3R, que presentan la mayor afinidad por la dopamina, son lo suficientemente sensibles para detectarla cuando ésta difunde fuera de la sinapsis. En aquellas áreas en que el nivel de dopamina está finamente regulado como en el estriado, en que las sinapsis están repletas de autorreceptores presinápticos D_2R y D_3R así como de DAT, muy poca dopamina podrá escapar de la sinapsis, mientras que en regiones como la corteza prefrontal en que la expresión de DAT y autorreceptores dopaminérgicos es muy baja, la dopamina liberada será libre para difundir hacia regiones cercanas. Esto resulta relevante para los D_3R extrasinápticos, que serán capaces de activarse en otras neuronas, como las GABAérgicas, y actuar como heterorreceptores inhibiendo la liberación de GABA (Stahl, 2017).

En múltiples condiciones patológicas se han observado diferencias en el nivel de expresión de receptores de dopamina, así como en su señalización (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Entre las más estudiadas están la variación de la señalización de D_1R en la enfermedad de Parkinson (Graybiel et al., 1994), el incremento de la densidad de D_2R postsinápticos en esquizofrenia y en enfermos de Parkinson no tratados con L-DOPA (Abi-Dargham et al., 2000; Matsukawa et al., 2007), así como el desequilibrio en la expresión de receptores D_1 y D_2 asociado al aumento de la motivación por la búsqueda y consumo de sustancias de abuso (Park et al., 2013). En pacientes de Parkinson tratados con L-DOPA, se ha observado un aumento de expresión de D_3R en el estriado dorsal y se ha relacionado con la aparición de la disquinesia asociada al tratamiento con L-DOPA (Payer et al., 2016). Concretamente, se cree que se produce un aumento del número de heterómeros D_1R-D_3R, de manera que el tratamiento de la disquinesia con antagonistas de D_3R estaría ejerciendo su efecto terapéutico mediante la reducción de la señalización del D_1R, derivado de su heteromerización (Solís and Moratalla, 2018; Solís et al., 2017).

1.3.3 Circuitos dopaminérgicos y su relevancia fisiológica en el SNC

Aunque las neuronas dopaminérgicas no son muy numerosas (<1/100.000 neuronas cerebrales), tienen un papel esencial en la regulación de múltiples aspectos funcionales del cerebro y se organizan formando cuatro grandes grupos (Moore and Bloom, 1978; Ungerstedt, 1971). Uno de ellos está localizado en el núcleo arcuato de la eminencia media hipotalámica y proyecta hacia la hipófisis, formando parte de la vía tuberoinfundibular e implicado en la regulación neuroendocrina; otro transmite dopamina desde la SNc hasta el cuerpo estriado (vía nigroestriatal); los otros dos se encuentran en el mesencéfalo ventral y proyectan en un caso hacia la corteza (vía mesocortical) y en el otro hacia el NAc (vía mesolímbica) (Ayano, 2016) (Figura 20). En la vía tuberoinfundibular, la dopamina es liberada desde las proyecciones del núcleo arcuato a los vasos sanguíneos del sistema endocrino hipotálamo-hipófisis, actuando así como hormona y ejerciendo su principal acción inhibiendo la secreción de prolactina por parte de la hipófisis. En las vías nigroestriatal, mesolímbica y mesocortical, la dopamina actúa como neurotransmisor y está implicada en la regulación de procesos como el control motor, la motivación y la memoria de trabajo, respectivamente (Björklund and Dunnett, 2007) (Figura 21).

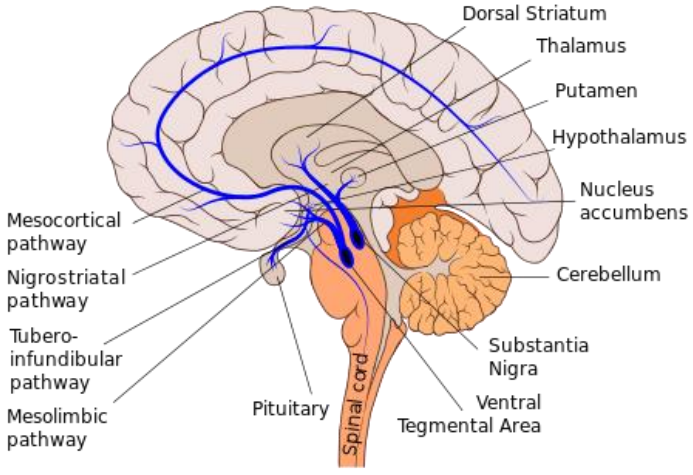


Figura 20. Principales vías dopaminérgicas en el cerebro humano.

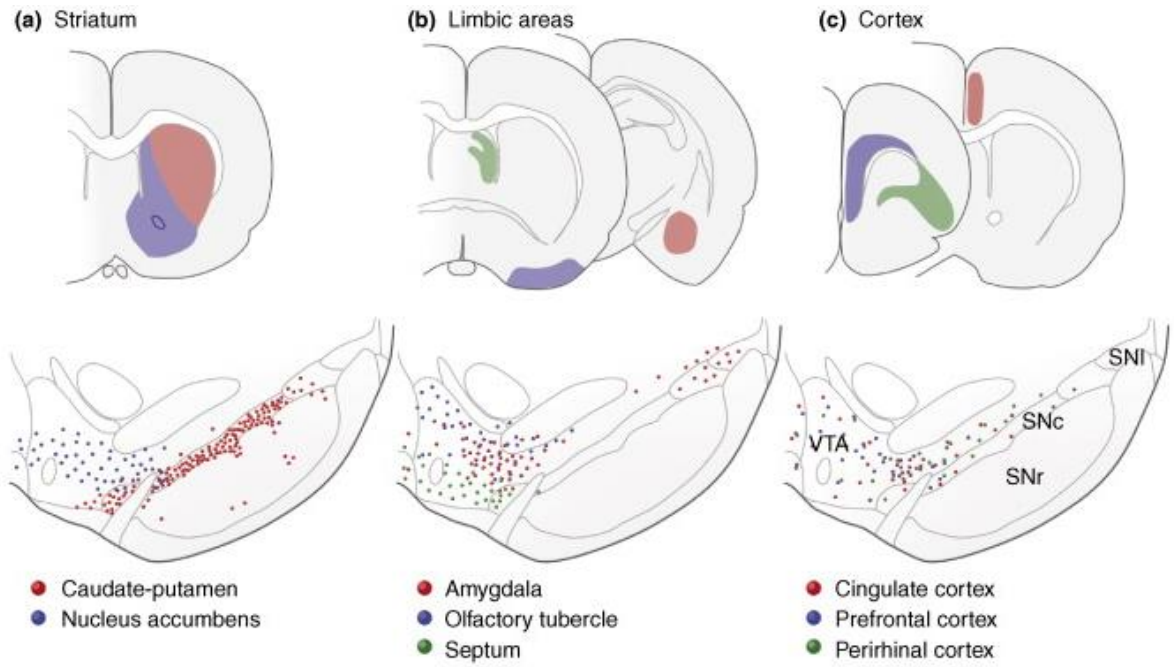


Figura 21. Representación del origen neuronal de las vías dopaminérgicas nigroestriatal (a), mesolímbica (b) y mesocortical (c). (Extraído de Björklund and Dunnett, 2007).

Los ganglios basales juegan un papel central en la regulación dopaminérgica y están fuertemente interconectados con la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico. Están constituidos por el núcleo estriado, el globo pálido (GP), la SN y el núcleo subtalámico (Figura 22). El estriado es el mayor componente de los ganglios basales y contiene dos regiones funcionalmente diferenciadas: la región dorsal, implicada en el aprendizaje y comportamientos motores complejos, y la ventral, que participa en la conversión de la motivación en acción. En primates, el estriado dorsal se subdivide en el núcleo caudado (zona medial) y el putamen (zona lateral). Ambos reciben inervaciones principalmente de la SNc y de la corteza, aunque de regiones corticales distintas; el núcleo putamen recibe inervaciones predominantemente desde la corteza sensoriomotora, mientras que el caudado lo hace desde la corteza asociativa (Gerfen, 1984; Herrero et al., 2002; Künzle, 1975). El estriado ventral lo conforman el tubérculo olfatorio y el NAc; este último recibe, al igual que algunas porciones del estriado dorsal, inervaciones glutamatérgicas de la corteza frontal y de regiones límbicas. En cambio, las inervaciones dopaminérgicas hacia el NAc provienen de la VTA, núcleo del mesencéfalo ventral adyacente a la SNc, y constituyen la vía mesolímbica dopaminérgica (Brog et al., 1993; Nicola, 2007).

Las neuronas más numerosas en el estriado son las MSN (*Medium Spiny projection Neurons*), constituyendo el 75% del total en primates y hasta el 95% en roedores y gatos (Graveland and DiFiglia, 1985). El segundo gran grupo de neuronas lo conforman interneuronas, GABAérgicas o colinérgicas, que son típicamente espinosas pero que, a diferencia de las MSN, no envían proyecciones fuera del estriado (Tepper et al., 2010). Por último, existe una pequeña cantidad de interneuronas que expresan la enzima TH en esta región, que fueron consideradas dopaminérgicas en un primer momento (Dubach et al., 1987; Ikemoto et al., 1996), pero que actualmente se consideran interneuronas inhibidoras GABAérgicas TH-positivas, ya que no expresan otras enzimas y transportadores necesarios para funcionar como neuronas dopaminérgicas (Xenias et al., 2015).

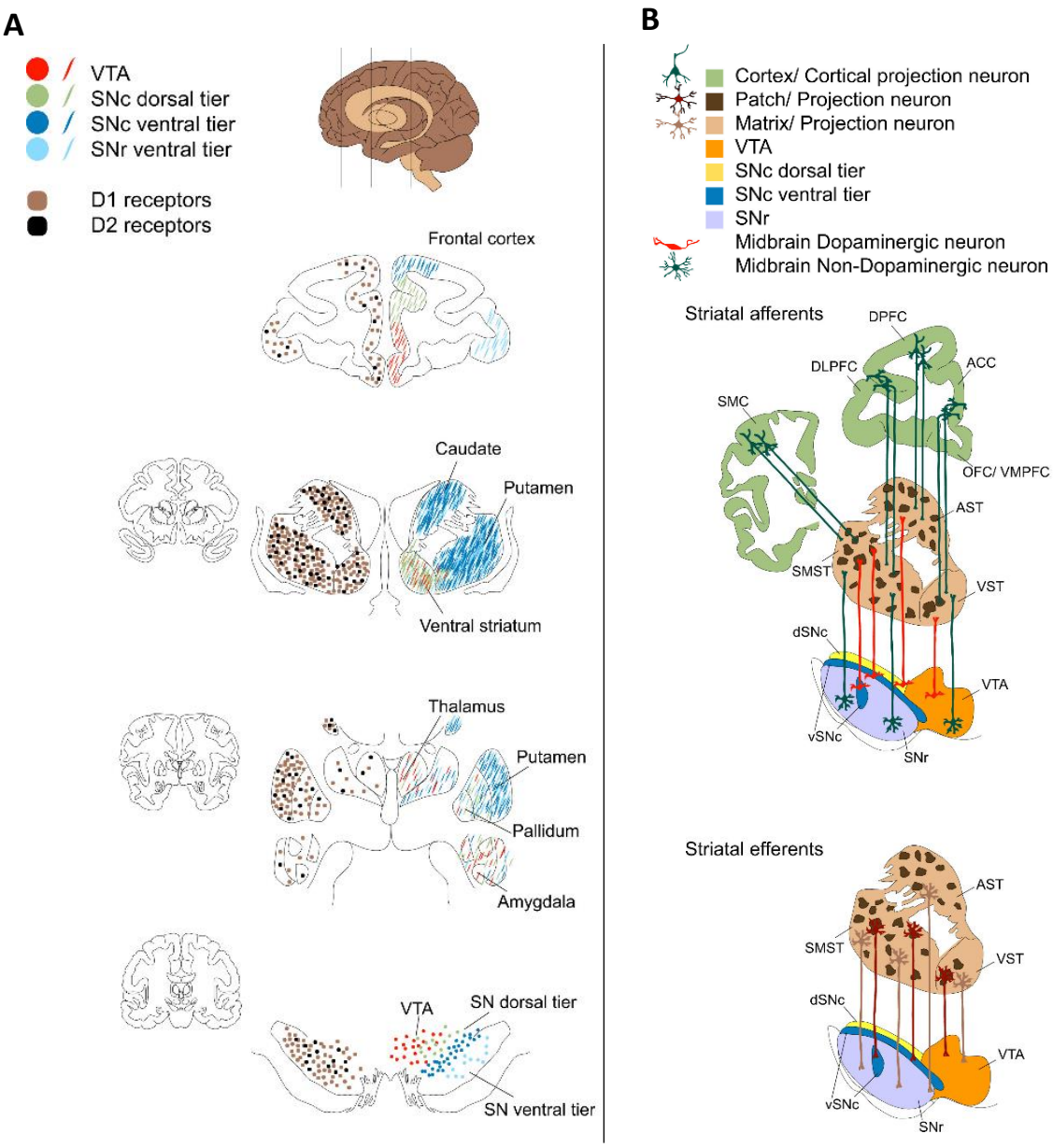


Figura 22. Representación de las principales conexiones cerebrales en que se encuentran implicados los ganglios basales. En (A) se muestra la topografía de las inervaciones dopaminérgicas (hemisferio derecho), así como la distribución de los receptores dopaminérgicos (hemisferio izquierdo), en el cerebro humano. En (B) se muestran las proyecciones aferentes y eferentes del núcleo estriado. (Extraído de Weinstein et al, 2017).

Las MSN forman espinas dendríticas con las que realizan conexiones sinápticas con las inervaciones aferentes glutamatérgicas procedentes de la corteza y dopaminérgicas procedentes de la SNc (en el estriado dorsal) y la VTA (en el estriado ventral). Se trata de neuronas inhibitorias ya que usan GABA como neurotransmisor, expresan DARPP-32 (*dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein, molecular weight 32 kDa*) y presentan patrones de descarga únicos (Kreitzer, 2009). Pueden clasificarse en dos tipos en función de la expresión diferencial de ciertos péptidos y receptores dopaminérgicos. Las MSN que forman parte de la vía motora directa, cuya estimulación resulta en una desinhibición tálamo-cortical y por tanto a la activación motora, expresan dinorfina, sustancia P y D_1R y proyectan directamente al GPi y la SNr. Las MSN que expresan encefalina y D_2R proyectan al GPe y pertenecen a la vía indirecta, inhibidora del movimiento (Yetnikoff et al., 2014; Yin and Knowlton, 2006) (Figura 23). Esta disposición diferenciada de las MSNs conlleva que la liberación de dopamina desde la SNc active la vía

directa a través de los D_1Rs e inhiba la vía indirecta por su acción sobre los D_2Rs, de manera que actuando sobre las dos vías coincide la activación del movimiento y éste se produce de una forma controlada. Si no se libera suficiente dopamina, como sucede en la enfermedad de Parkinson por una degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SN, las señales que derivan de la vía directa e indirecta son opuestas y permiten explicar la aparición de alteraciones motoras como la bradiquinesia (Nelson and Kreitzer, 2014). En los últimos años, la visión de los ganglios basales está cambiando y no se ve como una simple estructura en que las conexiones e interacciones funcionales se dan undirieccionalmente, sino que existen microcircuitos que comportan una inervación recíproca más extensa, aportando mayor complejidad a su señalización (Obeso and Lanciego, 2011).

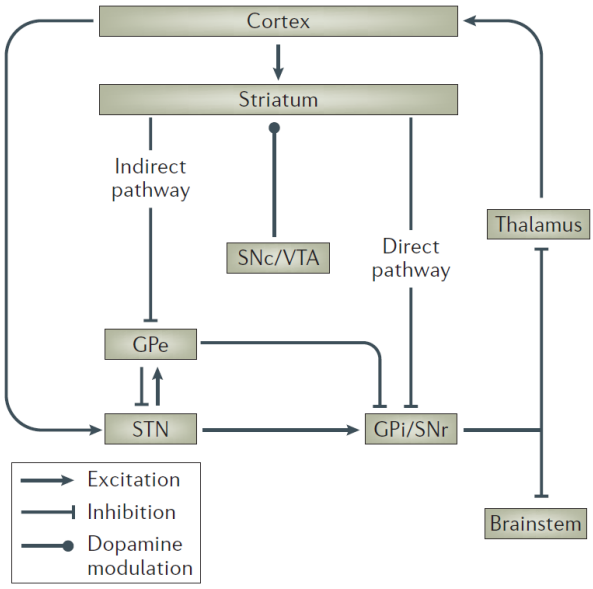


Figura 23. Representación esquemática de las principales conexiones de los ganglios basales implicadas en las vías motoras directa e indirecta. (Extraído de Yin and Knowlton, 2006).

1.3.4 Receptor D_1: mecanismos de señalización

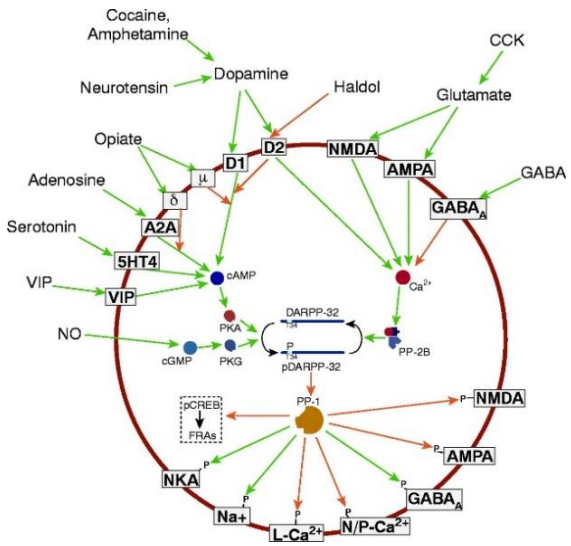


Figura 24. Vías de señalización en el neoestriado. (Extraído de Greengard, 2001).

El receptor D_1R media su respuesta fisiológica por la activación de diversos mecanismos de señalización. La que ha parecido ser la principal vía de señalización y ha resultado más estudiada consiste en el acoplamiento a las proteínas G estimuladoras Gαs o Gαolf, que provoca una activación secuencial de la AC y la PKA, la cual fosforila la treonina 34 de DARPP-32, que a su vez inhibe a la proteína fosfatasa-1 (PP-1) previniendo la desfosforilación de múltiples proteínas. El descubrimiento de DARPP-32 (Walaas et al., 1983) ha sido clave para entender el mecanismo de acción de la dopamina y de sus interacciones con otros neurotransmisores, fármacos y drogas de abuso. La expresión de DARPP-32 está altamente concentrada en el neoestriado (núcleos caudado y putamen) y en el NAc. Las neuronas neoestriatales que contienen DARPP-32 constituyen la única vía eferente a través de la cual la información se transmite fuera de esta región cerebral y deben integrar información procedente de múltiples regiones cerebrales, proceso en que DARPP-32 juega un papel central (Greengard et al., 1999) (Figura 24). La activación de D_1R conlleva la fosforilación de DARPP-32, previa activación de la PKA debida al incremento en la producción de cAMP, mientras que mediante la activación de D_2R DARPP-32 es desfosforilada por 2 mecanismos sinérgicos: la inhibición de la producción de cAMP y el incremento intracelular de Ca^{2+}, que es capaz de activar a calcineurina (PP2B), que a su vez desfosforila a DARPP-32. Los demás neurotransmisores que actúan directamente

alterando la fisiología de las neuronas dopaminoceptivas también lo hacen modificando el estado de fosforilación de DARPP-32, y ésta a su vez promueve la fosforilación de aquellos receptores que han inducido su fosforilación (Greengard, 2001). Además, DARPP-32 también puede ser fosforilada en otro residuo, la treonina 75, por acción de la enzima CDK5 (*cyclin-dependent kinase 5*) (Bibb et al., 1999). Aunque es generalmente conocida por su implicación en el ciclo celular, la CDK5 tiene importantes funciones en el sistema nervioso. Entre ellas, la fosforilación de DARPP-32 la convierte en un inhibidor de la PKA, participando así la CDK5 en la finalización de la señalización de la vía del cAMP. Esta regulación parece ser importante en las respuestas adaptativas de las neuronas estriatales a la estimulación repetitiva de los receptores de dopamina por acción de la cocaína (Bibb et al., 2001).

Si bien la señalización vía incrementos de cAMP es la más aceptada para los D_1R, existen ciertas controversias que sugieren también otras posibilidades (Beaulieu et al., 2015; Neve et al., 2004). Por un lado, se ha reportado que los D_1R estriatales parecen estar acoplados a proteínas Gαi cuando se reconstituyen en vesículas de fosfolípidos (Sidhu et al., 1991) y la CoIP con anticuerpos específicos contra distintos subtipos de proteína G ha sugerido que el D_1R también interactúa con Gαo (Kimura et al., 1995). Además, estudios realizados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral demostraron que los receptores D_1 y H_3 de histamina son capaces de heteromerizar y que como consecuencia el D_1R es capaz de señalizar vía Gαi en células co-transfectadas con ambos receptores (Ferrada et al., 2009). Por otro lado, la estimulación de los D_1Rs también parece causar una movilización de Ca^{2+} intracelular vía PLC y de una forma independiente de cAMP, de manera que se ha sugerido una posible activación de proteínas Gαq para mediar la formación de fosfoinositoles en estriado de rata (Wang et al., 1995). En cambio, otros autores indican que D_1R no es capaz de estimular el recambio de fosfoinositoles y se ha descrito que ni D_1R ni D_5R afectan al nivel de Ca^{2+} intracelular en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) (Pedersen et al., 1994), aunque D_1R promueve la movilización de Ca^{2+} intracelular mediante la activación de PLC en oocitos de Xenopus (Mahan et al., 1990). Estudios más recientes apuntan a que sería el D_5R el principal regulador de la señalización a través de Gαq *in vivo* y que el D_1R debe interaccionar con otras proteínas para poder acoplarse a Gαq (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Beaulieu et al., 2015). El conjunto de estos resultados sugiere que la señalización generada tras la activación de los D_1Rs dependerá de la célula en la que se produzca, es decir, que la señalización depende del conjunto de proteínas G y otros componentes propios de cada célula.

Además de las interacciones con proteínas G, los receptores D_1 establecen otras interacciones proteína-proteína críticas para la regulación de su señalización (véase apartado 1.3.5 Interacciones del receptor D_1 con otras proteínas en el SNC). Por un lado, cabe destacar la oligomerización con otros receptores de membrana, no sólo con otros GPCRs como el receptor H_3 de histamina (H_3R) (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011a) o el D_3R (Fiorentini et al., 2008; Guitart et al., 2014; Marcellino et al., 2008), sino también con receptores ionotrópicos como el NMDAR (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004) o con el receptor sigma-1 (σ_1R) (Navarro et al., 2010), todos ellos objeto de estudio de esta Tesis Doctoral en el contexto de la adicción a drogas de abuso y de enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Huntington y Alzheimer. Por otro lado, la interacción con enzimas o con proteínas de andamiaje que faciliten la activación de determinadas vías de señalización también resulta determinante en la señalización de D_1R (Tabla 1). Como se ha comentado anteriormente, el receptor D_1 también se ha relacionado con la activación de la vía de las MAPKs. Se ha descrito que la unión de un agonista a este receptor induce la activación de ERK1/2, p38 y JNK en células de neuroblastoma humano, a través de un mecanismo dependiente de PKA en el caso de p38 y JNK y parcialmente independiente de PKA o cAMP en el caso de ERK1/2 (Neve et al., 2004). También se ha descrito que la activación de ERK1/2 en el estriado de ratones, después de una administración

aguda de cocaína o de tetrahidrocannabinol (THC), es bloqueada por un antagonista de D_1R, lo que sugiere que este receptor controla la actividad estriatal inducida por ciertas drogas de abuso a través de una vía dependiente de ERK1/2 (Valjent et al., 2004). Así, el mecanismo que subyace a la activación de MAPKs dependerá del tipo celular y nivel de activación del receptor, pudiéndose producir también por la transactivación de RTKs como la Trkβ (*Tyrosine receptor kinase B*) o bien mediante el reclutamiento de β-arrestinas y la internalización del receptor (Kotowski et al., 2011).

Las cascadas de señalización iniciadas por los D_1R también pueden tener efectos a largo plazo en las funciones celulares mediante la regulación de factores de transcripción. La fosforilación de CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) en la serina 133, como resultado del incremento del nivel de cAMP, promueve la transcripción de muchos genes importantes en la respuesta a muchos fármacos (Sands and Palmer, 2008). El agonista de D_1R SKF-81297 ha mostrado mejorar el reconocimiento y memoria mediante el incremento de la fosforilación de CREB y DARPP-32 en corteza prefrontal de rata (Hotte et al., 2006), por lo que el desarrollo de fármacos con selectividad funcional que sean capaces de activar diferencialmente sustratos de CREB y DARPP-32 podrían tener una gran utilidad terapéutica. Otro efecto a largo plazo originado por niveles fisiológicos de dopamina son su capacidad de promover la plasticidad neuronal y de ejercer un efecto neuroprotector (Schapira, 2002; Yao et al., 2008), mientras que bajo ciertas circunstancias patológicas en las que se producen elevados niveles de dopamina extracelular se podrían iniciar cascadas de muerte apoptótica en neuronas postsinápticas. Se ha hipotetizado que este mecanismo podría explicar, al menos en parte, la neurodegeneración estriatal observada en ciertas enfermedades como la atrofia sistémica múltiple o la disfunción dopaminérgica secundaria en la enfermedad de Huntington (Hantraye, 1998). Concretamente, se ha sugerido que los efectos neurotóxicos inducidos por dopamina se producen mediante dos mecanismos diferentes: a través de la sobreactivación de D_1R y por la autooxidación de la dopamina a metabolitos tóxicos (Chen et al., 2009; Wersinger et al., 2004). La activación sostenida de D_1R provoca una activación continuada de p-ERK a través de la vía cAMP/PKA/Rap1/B-raf/MEK, en que la activación diferencial de las MAPKs JNK y p38 promueven la apoptosis celular (Chang and Karin, 2001). La oxidación de la dopamina puede producirse de forma regulada por parte de la enzima MAO o bien producirse a pH ligeramente básico sin intervención enzimática (autooxidación). En ambos casos se generan 6-OHDA y H_2O_2 y éste último provoca estrés celular oxidativo, incrementando la peroxidación de lípidos y proteínas (Lai and Yu, 1997). En la autooxidación de la dopamina, además de generarse H_2O_2, también se producen al menos otros cuatro metabolitos oxidantes que, por la oxidación directa de NADH y NADPH celulares, acabarán causando toxicidad y muerte celular (Giménez-Xavier et al., 2006).

La selectividad funcional ha sido difícil de demostrar para los receptores D_1-*like* debido a la falta de claros efectores acoplados al receptor (Boyd and Mailman, 2012). Un primer estudio identificó agonistas de D_1R capaces de activar a la AC con gran eficacia pero incapaces de inducir internalización (Ryman-Rasmussen et al., 2005). En este estudio, se observó que la eficacia mostrada en la internalización del receptor era independiente de la clase estructural del agonista, sugiriendo que la selectividad funcional sobre los D_1R no puede ser predicha por el simple estudio estructural de sus agonistas. Un estudio más reciente ha revelado que ciertos ligandos del receptor D_1 no inducen reclutamiento de β-arrestinas ni internalización del receptor pero sí activación de la AC, siendo además específico para D_1R ya que no mostraron dicha característica en los experimentos realizados con D_5R (Conroy et al., 2015). Estos resultados sugieren la posibilidad real de identificar fármacos con selectividad funcional para D_1R que presenten alta eficacia clínica, pero con una notable reducción en los efectos secundarios habituales como son la hipotensión o la tolerancia al fármaco.

1.3.5 Interacciones del receptor D_1 con otras proteínas en el SNC

Los receptores de dopamina pueden interaccionar con múltiples proteínas por sus bucles intra- y extracelulares, así como por el CTD. Las interacciones intracelulares ocurren con una gran variedad de proteínas que incluyen otros GPCRs, canales iónicos, proteínas del citoesqueleto, proteínas implicadas en señalización y proteínas adaptadoras (Agnati et al., 2005b; Pandey et al., 2013; Perreault et al., 2014a). Aunque en muchas situaciones los D_1R tengan una función antagónica a la de D_2R, se han descrito efectos sinérgicos cuando los dos receptores se expresan en la misma neurona, en la que se encontrarían formando hetero-oligómeros (George et al., 2014; Nolan et al., 2007; Waszczak et al., 2002). En mamíferos, los receptores D_1 y D_2 inducen una liberación de Ca^{2+} que presenta características distintas a las de la activación de los receptores por separado (Rashid et al., 2007) y han sido detectados formando heterómeros en subregiones estriatales (con un mayor porcentaje en NAc) donde median la activación de genes de expresión inmediata como *c-fos* (Perreault et al., 2014b). Además, se ha sugerido que una excesiva formación de este heterómero juega un papel importante en el trastorno depresivo mayor en humanos y su desacoplamiento ha mostrado efectos antidepresivos en un modelo de rata (Pei et al., 2010). Por otro lado, recientemente se han mostrado evidencias en contra de la formación de estos complejos, como el hecho de que no coincida la expresión de ambos receptores en la misma región de la neurona (Frederick et al., 2015; Lee et al., 2014b), de manera que son necesarios más estudios para disipar esta controversia.

También el receptor D_3R ha mostrado su capacidad de heteromerizar con D_1R. Ambos receptores presentan una destacada co-localización en ciertas neuronas de la vía directa nigroestriatal (Ridray et al., 1998) y se ha sugerido su heteromerización tras su estudio en sistemas heterólogos mediante técnicas de BRET y FRET, así como en estriado de rata mediante co-IP (Farré et al., 2015; Fiorentini et al., 2008; Guitart et al., 2014; Marcellino et al., 2008). El efecto fisiológico de esta interacción consiste, por un lado, en un incremento de las respuestas mediadas por D_1R y un incremento de la afinidad del D_1R por la dopamina cuando el D_3R es estimulado, y por otro lado en el impedimento de la internalización del D_1R por parte del D_3R, promoviendo el secuestro citoplasmático del heterómero en respuesta a la co-estimulación del complejo. Debido a que el D_1R juega un papel importante en el control motor por la vía directa de los ganglios basales, el estudio de interacciones alostéricas de D_3R sobre el D_1R en el heterómero podría ser de gran interés terapéutico para el tratamiento de disfunciones motoras, por lo que se ha sugerido como diana terapéutica potencial para la enfermedad de Parkinson (Ferré et al., 2010b; Solís and Moratalla, 2018; Solís et al., 2017), aunque también podría tener importantes implicaciones en trastornos que impliquen transmisión dopaminérgica vía D_1R, como la adicción a drogas (Perreault et al., 2014a) (véase ANEXO 7.1 *Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies*).

La existencia de heterómeros formados por el receptor D_1R y el receptor A_1 de adenosina fue sugerida por primera vez tras la demostración de su co-IP en fibroblastos (Ginés et al., 2000b) y poco después mediante el mismo método en NAc de rata (Toda et al., 2003). Estas entidades presentan una expresión selectiva en la corteza prefrontal y en los ganglios basales, especialmente a lo largo de la vía estriatonigral y serían las responsables, al menos en parte, de las interacciones antagónicas entre los receptores de adenosina y dopamina. La capacidad de estos heterómeros de atenuar la función de D_1R confiere relevancia a ligandos de A_1R como fármacos potenciales en desórdenes como el ADHD, disquinesias o adicción a drogas (agonistas de A_1R), así como la enfermedad de Parkinson (antagonistas de A_1R) (Ferré et al., 2001; Fuxe et al., 1998, 2010).

El receptor H_3 de histamina y el D_1R han mostrado su capacidad de heteromerizar en células transfectadas mediante ensayos de BRET (Ferrada et al., 2009) y en el núcleo estriado de rata mediante co-IP (Moreno et al., 2011a). A nivel funcional, la activación de ERK1/2 por parte de

H_3Rs únicamente se observó en cortes estriatales de ratón que también expresaban D_1R, pero no en aquellos procedentes de animales *knockout* (KO) para D_1R. Además, el tratamiento con antagonistas de cada receptor provocaba una atenuación en la activación de ERK1/2 del otro receptor en el heterómero (Moreno et al., 2011a). Por ello, se ha sugerido que este heterómero podría presentar relevancia como diana terapéutica en desórdenes en los que tanto el H_3R como el D_1R parecen estar implicados, como la esquizofrenia, adicción o el ADHD (Vohora and Bhowmik, 2012) (véase apartado 1.4.5 Interacciones del receptor H_3 con otros GPCRs: heterómeros D_1R-H_3R).

Otros heterómeros en los que se encuentra implicado no sólo el D_1R sino también el D_5R, son los que forman con los receptores de galanina 1 (Gal_1R), los cuales se demostraron tanto en células transfectadas mediante la técnica de BRET, como en el hipocampo ventral de rata mediante el análisis de la activación de la vía de las MAPKs (Moreno et al., 2011b). En este estudio se observó que la activación con agonistas y el bloqueo con antagonistas de los receptores de dopamina en los heterómeros D_1R-Gal_1R y D_5R-Gal_1R, potencia y contrarresta, respectivamente, la activación de la vía de las MAPKs inducida por la estimulación del Gal_1R, mientras que los ligandos del Gal_1R no modifican la activación de la vía de las MAPKs mediada por los receptores de dopamina. Un resultado interesante de este trabajo es la demostración de que la dopamina y la galanina funcionan coordinadamente para modular la neurotransmisión colinérgica en el hipocampo ventral de rata, aunque en esta modulación los D_5Rs tendrían un papel predominante debido a su mayor expresión en el hipocampo y a estudios previos que implican al D_5R en la modulación de la liberación de acetilcolina (Ach) en el hipocampo (Moreno et al., 2011b; Ciliax et al., 2000; Hersi et al., 2000).

Liu y colaboradores obtuvieron evidencias de una regulación dual de la función del NMDAR mediante interacciones directas con el D_1R (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004). Dos regiones del CTD del D_1R interaccionan con el NMDAR. Una de ellas lo hace con la subunidad NR1 y la activación de D_1R provoca la disrupción de esta interacción, lo que permite que el CTD de NR1 reclute calmodulina y PI3K, cuya activación conlleva una reducción en la excitotoxicidad. La otra región de D_1R interactúa directamente con la subunidad NR2A del NMDAR y parece estar implicada en la reducción del número de NMDARs en la superficie celular, lo que lleva a una reducción de la señalización mediada por este receptor. Además, existe una interacción recíproca en el heterómero por la que la activación de NMDAR promueve un reclutamiento de D_1Rs hacia la membrana plasmática, lo que lleva a un incremento de la señalización de D_1R (Pei et al., 2004), así como una disminución de la difusión lateral del D_1R, estabilizando así su localización en la sinapsis (Scott et al., 2006). Se ha sugerido que la reducción en la funcionalidad de D_1R y NMDAR podría contribuir a la etiología de la esquizofrenia y que, además, la hipodopaminergia existente en la corteza prefrontal inherente en esta enfermedad se produciría secundariamente a la disfunción de los NMDARs (Nai et al., 2010). En el estriado, la interacción D_1R-NMDAR se daría principalmente en las neuronas GABAérgicas de la vía directa, en las que los D_1R presentan predominantemente una localización extrasináptica. Esto es de especial interés ya que los NMDARs extrasinápticos fácilmente llevan a consecuencias excitotóxicas (Hardingham and Bading, 2003), con la activación de vías de señalización implicadas en muerte celular que podrían ser contrarrestadas por la activación de D_1R. En cambio, la señalización de los NMDARs sinápticos estaría principalmente regulada a través de los bucles intracitoplasmáticos fosforilables por PKA del D_1R (Flores-Hernández et al., 2002), proceso en el que DARPP-32 juega un papel central favoreciendo el incremento en la señalización de los NMDARs (Figura 24) (Blank et al., 1997; Greengard et al., 1999) (véase apartado 1.5.4 Interacción del receptor NMDA con otros receptores: heterómeros NMDAR-D_1R).

Otra proteína que ha demostrado su capacidad de heteromerizar con el D_1R es el σ_1R (Navarro et al., 2010), una proteína chaperona asociada a membrana con múltiples funciones biológicas,

capaz de modular la excitabilidad, la plasticidad y la viabilidad celular. Esta interacción implica un mínimo de un homodímero de D_1Rs y un σ_1R, en consonancia con la naturaleza oligomérica de los D_1Rs (Kong et al., 2006). Mediante técnicas de inmunocitoquímica (ICC), se observó que la coexpresión de D_1R y σ_1R produce una alteración de la distribución subcelular del σ_1R, ya que en presencia del D_1R el σ_1R se expresa más en la membrana plasmática que en membranas intracelulares. A nivel funcional, se ha descrito que esta interacción conlleva una potenciación de la producción de cAMP por parte de D_1R cuando σ_1R es activado por cocaína y se ha propuesto como uno de los mecanismos por los que esta droga de abuso provoca sus efectos a corto plazo (Anderson and Pierce, 2005; Navarro et al., 2010) (véase apartado 1.6.4 Implicación del receptor sigma-1 y el receptor D_1 en la adicción a cocaína).

Recientemente ha sido publicado que mediante la heteromerización del μOR con el D_1R en el estriado de ratón, antagonistas del D_1R son capaces de antagonizar la señalización mediada por el μOR de una forma independiente de la liberación de dopamina, muy probablemente mediante interacciones alostéricas entre los dos protómeros del heterómero (Tao et al., 2017), aunque previamente ya se habían detectado los efectos alostéricos farmacológicos y funcionales de esta heteromerización (Becker et al., 2001; Tien et al., 2007).

Otra forma en la que los receptores de dopamina pueden mostrar un *crosstalk* con vías de señalización iniciadas por otros receptores, además de las interacciones directas receptor-receptor, es a través de la interacción con una serie de proteínas intracelulares que ayudarían a la integración de la información de las dos vías (Tabla 1). Entre ellas se encuentran las arrestinas que, como se ha comentado anteriormente, son importantes proteínas que asisten en la desensibilización y re-sensibilización durante la señalización de los GPCRs, además de actuar como proteínas de andamiaje promoviendo la asociación estable de proteínas señalizadoras con el receptor y de participar en la formación de vesículas recubiertas de clatrina para la internalización y posible degradación o reciclaje del receptor. Otras proteínas, como la calnexina, presente en el RE, interaccionan con D_1R y D_2R y controlan su expresión en la superficie celular y por tanto su capacidad de señalización (Free et al., 2007). Por otro lado, la interacción del D_1R con otras proteínas también afecta a su actividad constitutiva, la cual puede verse modificada en función de tres principales factores: los subtipos de PKCs que se encuentren activadas; la localización o no del receptor en balsas lipídicas, las cuales regulan negativamente su activación constitutiva) y los subtipos de GRKs expresados en la célula (GRK2, GRK3 y GRK5 aumentan su activación constitutiva) (Zhang et al., 2014). La necesidad de identificar proteínas

Tabla 1. Función celular de proteínas capaces de interaccionar con receptores de dopamina. (Extraído de Pandey et al., 2013).

Mammalian DA receptor interacting proteins	
Protein	**Function [Reference]**
Calcium binding protein S100B	Increased D2 receptor stimulation of extracellular signal-regulated kinases and inhibition of adenylate cyclase [41].
CaM Kinase II	Phosphorylation by CaMKII sensitizes D3 receptor [45].
NCS-1	Desensitization of D2 receptor through calcium sensing [49].
Arrestin 2	Desensitization through inhibition of D2 receptor-G-protein interaction [23].
ER protein Calnexin	Trafficking of D1 and D2 receptors to the cell surface [34].
Protein 4.1 N	Cell surface expression and co-localization and stability of D2 receptor subtypes [54].
Spinophilin (Neurabin)	Provides scaffold for D2 receptors and relay molecules [42].
Neurofilament M	Regulates D1 cell surface expression, and receptor desensitization [56].
Filamin- A	Adaptor for linking D2-like receptors with cytoskeletal actin [40,57].
Paralemmin	Attenuation of D2 mediated as well as receptor-independent generation of cAMP [59].
CLIC6	Interaction with D2 receptors potentially regulates chloride channel [61].
β-catenin	D2 receptors' interaction with β-catenin inhibits wnt/calcium signaling pathway [64].
NCAM-180	Internalization of D2 receptors [66].
Transient receptor potential channel TRPC1	D2 interaction enhances TRP1 delivery to cell surface [67].
GIPC	Attenuates D2 signaling through regulator of G-protein RGS19 [70].
Gamma COP	Transport of D2 receptors to neuronal membrane [71].
DRiP78	Transport of D1 receptors from ER to neuronal membrane [35].

capaces de interactuar con receptores dopaminérgicos y de influir directamente en sus vías de señalización resulta de gran importancia para evaluar su potencial como dianas terapéuticas.

1.4 Sistema histaminérgico

1.4.1 La histamina como neurotransmisor

La presencia de la histamina, así como sus efectos biológicos, fueron detectados por primera vez en 1910 por su acción periférica sobre la contracción de la musculatura lisa en el estómago y sus efectos vasodilatadores (Dale and Laidlaw, 1910). No fue hasta 1943 que se demostró su presencia en tejido nervioso y hasta 1959 su formación y catabolismo en el cerebro *in vitro* (Kwiatkowski, 1943; White, 1959). En 1972, la definición del receptor tipo 2 de histamina (H_2R) revolucionó el tratamiento de la úlcera gástrica, pero no fue hasta 1984, año en que se aportaron pruebas histológicas de la existencia de neuronas histaminérgicas en el cerebro, que la histamina fue reconsiderada como neurotransmisor (Panula et al., 1984; Watanabe et al., 1984).

La histamina o 2-[4-imidazol]-etilamina es una amina biogénica sintetizada a partir de la descarboxilación oxidativa del aminoácido L-histidina por parte de la enzima histidina descarboxilasa (HDC) y es producida tanto en tejidos periféricos como en el SNC. La histamina no atraviesa la BBB, de manera que su síntesis estará limitada por la HDC y por la disponibilidad de L-histidina. En los tejidos periféricos, es sintetizada por mastocitos y basófilos para mediar respuestas inflamatorias y por las células enterocromafines del estómago para controlar la liberación de ácido clorhídrico. En el SNC, las únicas neuronas capaces de sintetizar histamina son las del núcleo tuberomamilar (TMN) en el hipotálamo posterior, que proyectan a lo largo de todo el SNC (Haas and Panula, 2003; Haas et al., 2008) (Figura 25). Además de histamina, las neuronas del TMN también sintetizan otros neurotransmisores de gran importancia como la galanina, la dopamina, la serotonina, la noradrenalina y el GABA (Flik et al., 2015; Yanovsky et al., 2011), el cual se considera una fuente extrasináptica importante que activaría los canales $GABA_A$ preferencialmente por su elevada afinidad por este neurotransmisor, mediando la inhibición tónica extrasináptica (Vincent et al., 1983). El TMN lo constituyen aproximadamente 64.000 neuronas histaminérgicas en el cerebro humano y unas 6.400 en el de rata. Además, este tipo neuronal se ha encontrado siempre localizado en la misma región cerebral en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha (Panula and Nuutinen, 2013).

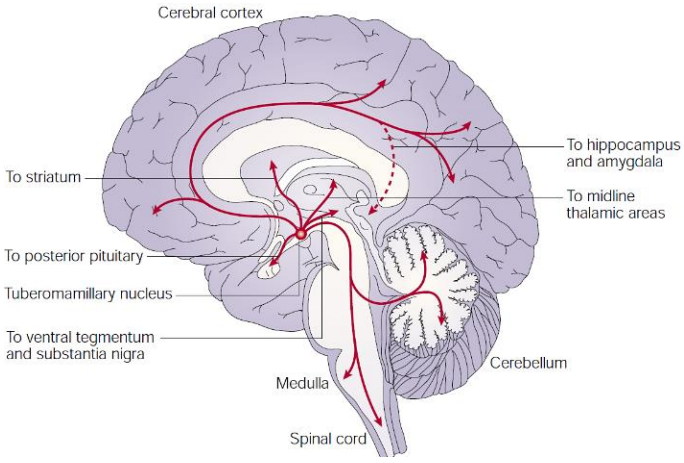


Figura 25. Origen y proyecciones del sistema histaminérgico en el cerebro humano. (Extraído de Haas and Panula, 2003).

Una vez sintetizada, al igual que ocurre con otras aminas biogénicas como la dopamina, la noradrenalina o la serotonina, la histamina es transportada al interior de vesículas mediante el VMAT2 (Figura 26). Tras la liberación de la histamina al exterior celular, en ausencia de un sistema de recaptación de alta afinidad, el principal mecanismo de inactivación consiste en su metabolización a *N*tele-metilhistamina por la acción de la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT), presente en el citosol de las neuronas postsinápticas y de los astrocitos (Nishibori et

al., 2000; Yoshikawa et al., 2013). Esto sugiere que la histamina podría difundir desde la zona de liberación y provocar efectos diseminados, actuando como una hormona local sobre la actividad neuronal y glial, así como sobre el mantenimiento del tono vascular (Wada et al., 1991). Aun así, la HNMT juega un papel esencial en la regulación de los niveles de histamina cerebrales y recientemente se ha demostrado su implicación en la regulación de la agresividad y del ciclo de sueño-vigilia (Naganuma et al., 2017). Asimismo, el correcto funcionamiento de los transportadores de monoaminas que permitan la entrada de histamina a la célula y la posterior actuación de la HNMT, también resulta esencial en la disminución de los niveles de neurotransmisor en la sinapsis, no sólo de histamina sino también de dopamina y serotonina (Yoshikawa and Yanai, 2017). La tasa de renovación de la histamina neuronal es bastante alta, con una vida media de unos 30 minutos, lo que permite considerar los niveles de histamina cerebrales como una aproximación de la liberación de histamina neuronal (Taylor and Snyder, 1971). No obstante, su tasa de renovación puede verse modificada bajo ciertas condiciones, de manera que la medición directa por microdiálisis siempre será un método más preciso. Diversos estudios funcionales han demostrado que las neuronas histaminérgicas del TMN son en realidad heterogéneas, ya que están organizadas en circuitos funcionalmente distintos y con mecanismos de control también distintos (Blandina et al., 2012). En el SNC, además de las neuronas del TMN, también los mastocitos contienen niveles significativos de histamina cerebral, pero se encuentran distribuidos de forma limitada en el tálamo, hipotálamo, *dura mater*, leptomeninges y plexo coroideo (Ibrahim, 1974). Otras posibles fuentes de histamina en el cerebro incluyen a la microglía y a las células endoteliales microvasculares, aunque todavía se desconoce en gran medida cual es la función de la histamina no neuronal (Hu and Chen, 2017).

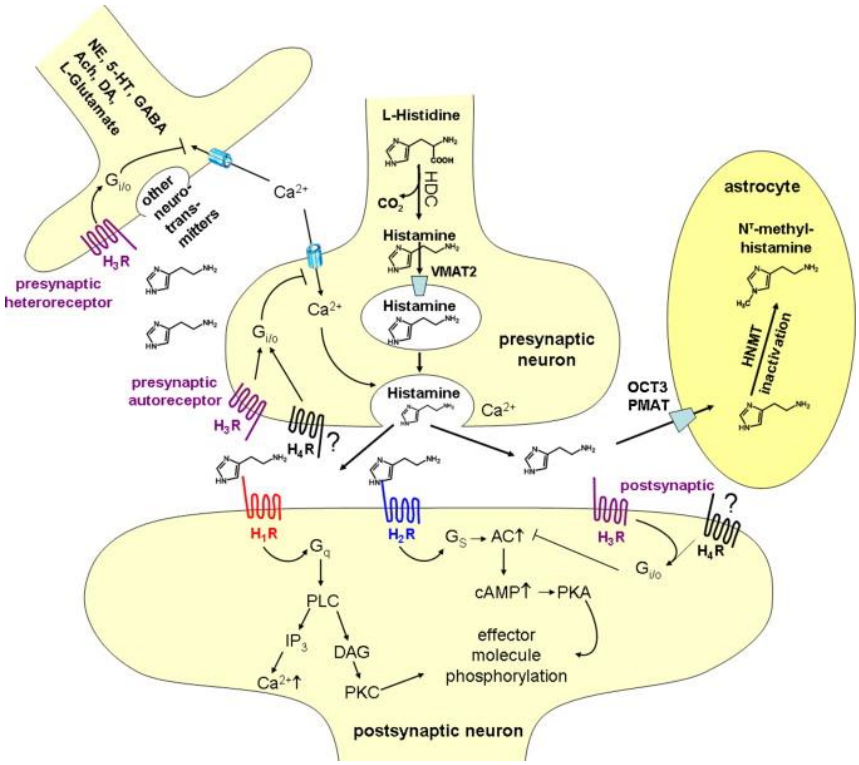


Figura 26. Síntesis, acción e inactivación de la histamina en la sinapsis histaminérgica. (Extraído de Schneider et al., 2014a).

1.4.2 Receptores de histamina: estructura, clasificación y expresión diferencial.

El carácter regulador pleiotrópico de la histamina se atribuye a su unión a cuatro GPCRs distintos, H_1R, H_2R, H_3R y H_4R, expresados diferencialmente en varios tipos celulares y con diferencias en la unión de ligandos, vías de señalización y funciones (Haas et al., 2008; Hill et al., 1997; Parsons and Ganellin, 2006; Schwartz et al., 1991). En humanos, la histamina muestra una afinidad baja por los receptores H_1R y H_2R, mientras que su potencia sobre H_3R y H_4R es considerablemente mayor. En cuanto a su relación filogenética, los receptores H_3R y H_4R están más relacionados entre ellos y con GPCRs que unen ligandos peptídicos, comparado con otros receptores de aminas biogénicas, incluidos los receptores H_1R y H_2R (Tiligada et al., 2011). En cuanto a su distribución, presentan una expresión diferencial, con los H_3R localizados principalmente en el SNC y los H_4R aparentemente confinados a linfocitos periféricos y glía, mientras que H_1R y H_2R tienen una amplia distribución en todo el organismo (Hu and Chen, 2017; Sadek et al., 2016). En el cerebro, los receptores H_1R y H_2R han sido detectados en células neuronales y gliales, el H_3R se expresa principalmente en neuronas y con menor densidad en oligodendrocitos y el H_4R parece expresarse en mastocitos y microglía pero no en neuronas, aunque sobre este último aspecto existe actualmente cierta controversia por la falta de anticuerpos con elevada especificidad para H_4R (Beermann et al., 2012; Chen et al., 2017b; Schneider et al., 2014a).

Por lo que respecta a las vías de señalización celular, H_1R, H_2R y H_3R muestran acoplamiento a diferentes proteínas G, hecho que seguramente se refleja en la variedad de sus funciones. El H_1R se acopla a Gαq/11 y PLC y está implicado, en la periferia, en procesos de irritación y aumento de la permeabilidad vascular asociados a la formación de eritemas y edemas en las alergias tipo I, mientras que en el SNC modula comportamientos voluntarios e involuntarios como la actividad locomotora, las emociones, procesos cognitivos, el sueño y los ritmos circadianos, la percepción del dolor, la homeostasis energética y la respiración. Concretamente, en el cerebro se expresa en células vasculares, células gliales y neuronas de la corteza, hipotálamo, tálamo y tronco del encéfalo (Haas et al., 2008; Hill et al., 1997; Schneider et al., 2014b). El receptor H_2R se acopla a Gαs y en tejidos periféricos está implicado en el aumento de la secreción de ácido clorhídrico estomacal y en el aumento de la fuerza de contracción cardíaca, entre otras funciones. Se han hecho pocos estudios de comportamiento y se cree que en el SNC tiene funciones similares a H_1R. De hecho, colocaliza en algunas áreas con H_1R y, aunque se cree que éste es funcionalmente predominante, podría existir una sinergia entre ambos. La expresión de H_2R está más confinada a las proyecciones neuronales histaminérgicas, concretamente en la corteza, hipocampo, ganglios basales y amígdala (Haas et al., 2008; Hill et al., 1997; Schneider et al., 2014b). Los receptores H_1R y H_2R se expresan postsinápticamente, mientras que H_3R lo hace además y predominantemente en la membrana presináptica, controlando la liberación de la histamina (autorreceptor) y de otros neurotransmisores (heterorreceptor) como dopamina, serotonina, GABA, glutamato, Ach y NA, y de neuropéptidos como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Figura 26). El H_3R se acopla a Gαi/o y también es capaz de activar otras vías como las que implican a MAPKs, PLC, PLA_2 y PI3K. Además, la activación de H_3R, mediante la acción de las subunidades βγ de la proteína G, está acoplada negativamente a los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q, hecho que subyace a la inhibición presináptica, así como a la inhibición del intercambiador de Na^+/H^+ y a la activación de canales de K^+ rectificadores entrantes (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Leurs et al., 2005; Nieto-Alamilla et al., 2016). La gran mayoría de H_3Rs postsinápticos se expresan en los ganglios basales, especialmente en el estriado dorsal y ventral, corteza, hipocampo y NAc, mientras que los presinápticos se encuentran en múltiples tipos neuronales regulando la liberación de histamina y otros neurotransmisores (Ellenbroek and Ghiabi, 2014; Hu and Chen, 2017; Panula and Nuutinen, 2013; Pillot et al., 2002; Schneider et al., 2014a; Tiligada et al., 2011). El H_4R, al

igual que H_3R, se acopla a Gαi/o y se expresa principalmente en células inmunes, aunque se desconoce su papel en el cerebro, ya que no existen evidencias concluyentes de su expresión en neuronas (Beermann et al., 2012; Schneider and Seifert, 2016). Recientemente se ha propuesto que antagonistas de H_4R podrían resultar eficaces para el tratamiento del tinnitus, ya que éste receptor presenta niveles de mRNA considerables en áreas vestibulares (Hagenow and Stark, 2015).

Todos los receptores de histamina humanos exhiben grados variables de actividad constitutiva (Arrang et al., 2007; Bakker et al., 2000; Schneider et al., 2009; Wenzel-Seifert et al., 2001). Esta actividad espontánea en ausencia de ligando es indicadora de la importancia de los receptores histaminérgicos en el mantenimiento del equilibrio fisiológico (Kenakin, 2005). Además, se han descrito más de 20 variantes de *splicing* para H_3R y 3 para H_4R, lo que confiere aún más complejidad a la regulación ejercida por el sistema histaminérgico (Arrang et al., 2007; Walter and Stark, 2012) (véase apartado 1.4.4 Isoformas del receptor H_3)

1.4.3 Relevancia fisiológica y patológica del sistema histaminérgico

La histamina regula procesos cerebrales de gran complejidad, entre ellos el ciclo de sueño-vigilia. Antes del desarrollo de variantes que no penetraran la BBB, los fármacos antihistamínicos o antialérgicos causaban somnolencia, lo que sugirió la implicación de la histamina en el estado de alerta y el sueño. Como consecuencia, se han realizado muchos estudios en humanos y roedores con narcolepsia y han mostrado que la red del TMN es un componente esencial del sistema regulador del sueño y la vigilia. Este sistema combina señalización noradrenérgica, serotoninérgica, colinérgica histaminérgica, orexinérgica y GABAérgica y permite cambios rápidos de la vigilia al sueño (Saper et al., 2005). La liberación de histamina desde el TMN promueve el estado de alerta mediante la activación, al menos, de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y de las neuronas serotoninérgicas del núcleo rafe, a través de receptores H_1 (Haas and Panula, 2003). Por otro lado, agonistas inversos de H_3R promueven el estado de alerta promoviendo la liberación de histamina y otros neurotransmisores, aunque se cree que los receptores que tienen más peso en la regulación de este ciclo son H_1R y H_2R (Haas et al., 2008). Por otro lado, la histamina también ejerce una regulación sobre la ingesta. El efecto de la leptina, la hormona secretada por los adipocitos blancos con la función de inhibir el apetito, se ve notablemente disminuido en ratones KO para H_1R, hecho que sugiere que la histamina cerebral es necesaria para que la leptina ejerza sus efectos (Jørgensen et al., 2007; Morimoto et al., 1999). Además, tratamientos que llevan a un incremento en la disponibilidad de histamina en el SNC, ya sea por aumento de la L-histidina disponible o por la aplicación de antagonistas de H_3R que promuevan la liberación de histamina, han mostrado disminuir la ingesta de comida (Haas et al., 2008). A nivel neuroendocrino, la histamina también tiene un gran impacto en el metabolismo energético, la termorregulación, el balance de fluidos, el estrés y la reproducción (Haas et al., 2008; Schwartz et al., 1991). Por otro lado, estudios de comportamiento sugieren que el sistema histaminérgico también juega un papel importante en las funciones cognitivas, en que la histamina parece facilitar el aprendizaje y la memoria (Alvarez, 2009). De todas las implicaciones que presenta la histamina en las funciones cerebrales, la de promover el estado de alerta y atención por nuevos estímulos resulta de gran importancia para la adaptación de los organismos al ambiente cambiante, por comparación de los elementos nuevos con los que se recuerdan del pasado. Esto resulta decisivo para el correcto desarrollo del cerebro, su fisiología y patofisiología, así como para el reconocimiento del peligro y la supervivencia (Haas et al., 2008).

Como se ha comentado anteriormente, las células endoteliales de los vasos sanguíneos cerebrales expresan receptores histaminérgicos, lo que les confiere la capacidad de regular la permeabilidad de la BBB. Esto tiene relevancia en la patogénesis de la esclerosis múltiple, una enfermedad

progresiva autoinmune en la que las interacciones de las células inmunes periféricas con el SNC resultan esenciales. Actualmente, se cree que la enfermedad probablemente se inicia en el SNC a través de la interacción entre neuronas, oligodendrocitos y microglía, que resultaría en una permeabilidad capilar aumentada (Prat and Antel, 2005). Además, un estudio reciente ha revelado importantes hallazgos en relación a esta enfermedad: que los niveles de H_3R son elevados en pacientes con esclerosis múltiple y que su sobreexpresión regula negativamente la diferenciación oligodendrocítica y la remielinización; que ciertos agonistas inversos de H_3R promueven la diferenciación celular de precursores de oligodendrocitos, por lo que tienen el potencial de reestablecer la remielinización detenida o retardada en pacientes con esta enfermedad; y por último, también se validó una asociación genética entre un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) exónico en el H_3R y la susceptibilidad de sufrir esclerosis múltiple (Chen et al., 2017b).

Estudios recientes indican que alteraciones en múltiples componentes del sistema histaminérgico también pueden contribuir a la patogenia de desórdenes neuropsiquiátricos (Hu and Chen, 2017; Shan et al., 2015, 2017). Como se ha comentado en el inicio de este apartado, la histamina está implicada en la regulación del ciclo sueño-vigilia y se han detectado desajustes del sistema histaminérgico en desórdenes del sueño. Tanto en pacientes con narcolepsia como en pacientes con hipersomnia idiopática, el nivel de histamina en el líquido cefalorraquídeo está disminuido, hecho que aporta evidencias de que la histamina promueve el estado de alerta y vigilia (Nishino et al., 2009). Agonistas de H_1R y antagonistas de H_3R son fármacos prometedores para narcolepsia e hipersomnia, mientras que antagonistas de H_1R y agonistas de H_3R lo son para el control del insomnio (Passani et al., 2004; Schlicker and Kathmann, 2017). De hecho, en marzo de 2016 fue aprobado por la Comisión Europea el antagonista de H_3R pitolisant (Wakix®) para el tratamiento de la narcolepsia, y en el 2010 se aprobó el uso del antagonista de H_1R doxepina (Silenor®) para el tratamiento del insomnio, administrado a dosis bajas (Syed, 2016; Weber et al., 2010).

En desórdenes motores como la enfermedad de Parkinson, se han visto incrementados los niveles de histamina en la SN, putamen y GP y, concretamente, esta señal está confinada en las terminales nerviosas en lugar de, por ejemplo, los mastocitos (Rinne et al., 2002). Esto se correlaciona con los problemas de insomnio reportados por pacientes con PD y se cree que el incremento de histamina es consecuencia directa de la deficiencia dopaminérgica (Panula and Nuutinen, 2013). Además de la histamina, los niveles de H_3R también están aumentados en la SN de pacientes con PD (Anichtchik et al., 2001). Ya en 1998 se observó que la inhibición del H_3R con un antagonista específico incrementaba la actividad motora, indicando que la estimulación de H_3R induce una disminución en la locomoción, situación que se da en la PD por los elevados niveles de histamina (Chiavegatto et al., 1998). Además, en modelos animales de PD también se ha visto incrementada la expresión de H_3R, lo que sugiere que estos receptores juegan un papel importante en la regulación de la actividad motora y de los mecanismos neuronales subyacentes a la PD (Aquino-Miranda et al., 2012; Gomez-Ramirez et al., 2006).

Por otro lado, en humanos con AD los niveles de histamina se encuentran disminuidos en hipocampo, corteza temporal e hipotálamo, lo que sugiere que las neuronas histaminérgicas padecen neurodegeneración y contribuyen al declive cognitivo en esta enfermedad (Airaksinen et al., 1991; Shan et al., 2015). La disfunción cognitiva en animales de experimentación se ha visto disminuida por el tratamiento con antagonistas de H_3R y se cree que esta mejora se debe a un incremento en la liberación de Ach (Brioni et al., 2011). De hecho, muchos fármacos antagonistas de H_3R están siendo clínicamente investigados como terapia potencial para mejorar los déficits cognitivos que se dan, no sólo en la AD, sino también en el ADHD y la esquizofrenia, aunque muchos parecen no haber tenido el éxito esperado (Kubo et al., 2015; Kuhne et al., 2011; Łażewska and Kieć-Kononowicz, 2018).

Además de los déficits cognitivos, en enfermedades neurodegenerativas como AD y HD se producen eventos de muerte neuronal, hipotéticamente inducidos por un exceso de estímulos neurotóxicos, entre otras causas. Varios estudios han mostrado la capacidad de H_3R de estimular la neurogénesis así como su papel neuroprotector (Bernardino et al., 2012; Tiligada et al., 2011). Por un lado, se han visto incrementados sus niveles de mRNA en ratas después de inducirles una isquemia cerebral global transitoria, así como después de haberles provocado convulsiones con ácido kaínico (Kukko-Lukjanov et al., 2006; Lozada et al., 2005). Desde una perspectiva de funcionalidad, se descubrió que la estimulación de H_3R en neuronas corticales en cultivo activaba cascadas de señalización antiapoptóticas como la vía PI3K/Akt/GSK3β, además de aumentar la expresión del inhibidor de apoptosis Bcl-2 y disminuir la expresión de elementos proapoptóticos como la caspasa-3, después de haberse aplicado estímulos neurotóxicos (Mariottini et al., 2009). Un estudio reciente aporta evidencias algo contradictorias al respecto, ya que antagonistas de H_3R muestran un efecto neuroprotector durante la reperfusión posterior a una isquemia cerebral, señalando que el H_3R agrava el daño producido por la isquemia, aunque de una forma independiente de histamina (Yan et al., 2014).

En 2010 se reportó por vez primera que anormalidades en la neurotransmisión histaminérgica están implicadas de forma causal en el desarrollo de un desorden neuropsiquiátrico. Se trata de un estudio genético en que se detectó una mutación rara y dominante en el gen de la HDC como supuesta causa de síndrome de Tourette en una única familia con una excepcionalmente elevada incidencia de este desorden. La mutación provoca la traducción de una proteína truncada incapaz de producir histamina y con función dominante negativa, de manera que también impide que el gen *wild type* realice su función correctamente (Ercan-Sencicek et al., 2010). Estudios genéticos posteriores han aportado más evidencias de otras anormalidades en la señalización histaminérgica que también incrementarían el riesgo de sufrir síndrome de Tourette, como ciertos polimorfismos en el gen que codifica para HDC o genes importantes en la señalización de H_1R y H_2R (Fernandez et al., 2012; Karagiannidis et al., 2013). Aunque son necesarios más estudios, estos hallazgos proveen evidencias convergentes de que la desregulación de la señalización histaminérgica es un importante factor causal en al menos algunos casos de síndrome de Tourette (Rapanelli and Pittenger, 2016).

Por último, el uso de agonistas inversos sobre H_3Rs espinales y de antagonistas de H_1R parecen tener un efecto antinociceptivo, lo que resulta prometedor para el tratamiento del dolor neuropático, trastorno en el que también se ha visto implicada la histamina (Cannon and Hough, 2005; Schneider, 2017).

Existe un amplio rango de aplicaciones de los ligandos histaminérgicos como fármacos, seguramente debido al carácter modulador de la histamina sobre otros neurotransmisores en el cerebro. Además, esta modulación aplicada al tratamiento de enfermedades tiene la ventaja de presentar efectos secundarios menos severos, a diferencia de si se actúa directamente sobre sistemas de neurotransmisores excitatorios o inhibitorios. Por otro lado, el hecho de afectar a múltiples sistemas requiere de una expansión de nuestro conocimiento con respecto al papel de la histamina en el SNC (Hu and Chen, 2017). Se han desarrollado diversas generaciones de fármacos para los receptores H_1, H_2 y H_3 con la finalidad de ir mejorando su efectividad y traspaso de la BBB y de disminuir sus efectos secundarios. No se han desarrollado fármacos agonistas de los receptores H_1 ni H_2 debido a que tienen una fuerte y amplia acción periférica con numerosos efectos indeseables, pero sí se ha hecho lo propio con fármacos antagonistas para estos receptores. En el caso de H_1R, el efecto secundario predominante que presentan los antagonistas es la sedación, aunque también se ha detectado cardiotoxicidad, hecho que ha causado la retirada de 2 fármacos, así como afectación de las funciones cognitivas e incremento de la susceptibilidad de sufrir convulsiones, entre otros (Hu et al., 2012b; Simons et al., 1996).

Los ligandos de H_2R han sido poco estudiados para tratar desórdenes del SNC, pero ya en los años 80 se desarrollaron antagonistas para tratar las úlceras pépticas, como la cimetidina (Tagamet®). Aun así, se están desarrollando estudios que sugieren algunos fármacos como candidatos para el tratamiento de desórdenes como la esquizofrenia (Mehta and Ram, 2014). El receptor H_3R ha sido considerado como la mejor diana terapéutica para desórdenes cerebrales, ya que se expresa principalmente en el cerebro (Bolam and Ellender, 2016; Nuutinen and Panula, 2010). Los agonistas que se han desarrollado para actuar sobre el H_3R contienen el motivo imidazol, derivado de la histamina, mientras que los antagonistas de última generación han visto modificada su estructura para no contener este grupo químico, lo que ha supuesto una mejora sustancial en su capacidad de atravesar la BBB. Los fármacos basados en la estructura del grupo imidazol presentaban, además, otros inconvenientes como la interacción con el citocromo P-450, toxicidad hepática y ocular, así como efectos colaterales sobre otros receptores como el H_4R (Berlin et al., 2011; Leurs et al., 2005). Además, debido a que varios estudios han demostrado que la histamina y algunos antagonistas de H_3R pueden unirse y modular a otras proteínas del SNC, entre ellas los transportadores DAT y NET y el NMDAR (Burban et al., 2010; Hansen et al., 2010a; Mena-Avila et al., 2018), resulta fundamental comprobar si los fármacos diseñados presentan unión a otros receptores que, como el NMDAR, presentan sitios de unión a aminas. También sería necesaria la comprobación funcional de su capacidad moduladora, ya que en función de los efectos ejercidos sobre estas proteínas podría suponer tanto un inconveniente por la aparición de efectos secundarios adversos, como una ventaja farmacológica por el hecho de actuar sobre dos sistemas de neurotransmisores simultáneamente.

1.4.4 Isoformas del receptor H_3

El receptor H_3 fue descubierto en 1983 por el grupo de J.C. Schwartz y caracterizado como autorreceptor capaz de inhibir la liberación de histamina (Arrang et al., 1983). Más adelante, Lovenberg y colaboradores clonaron el receptor humano y el de rata, concretamente un gen que codificaba para una proteína de 70 kDa compuesta por 445 aminoácidos (Figura 27), lo que significó un gran avance para el estudio farmacológico y funcional del H_3R (Lovenberg et al., 1999, 2000). También se estudió su distribución *in vivo* mediante experimentos de hibridación *in situ* para detectar su mRNA y mediante métodos autorradiográficos con radioligandos selectivos para detectar la expresión de la proteína, que revelaron que el H_3R se expresa en múltiples tipos neuronales y regiones cerebrales y que las concentraciones más elevadas se observan en la corteza cerebral y los ganglios basales (Pillot et al., 2002; Pollard et al., 1993). Se revelaron localizaciones que eran consistentes con estudios funcionales previos, pero el papel fisiológico de muchos receptores presentes en el soma, dendritas y proyecciones neuronales sigue sin ser desvelado. Es más, muchas de estas localizaciones no van en paralelo a las inervaciones histaminérgicas, lo que conduce a la pregunta de si éstos receptores son activados y bajo qué circunstancias. Una posible explicación sería que, debido a la actividad constitutiva descrita para H_3R, estos receptores podrían ser activos espontáneamente en ausencia de histamina. Concretamente, se cree que una pequeña secuencia al final del tercer bucle intracelular que se

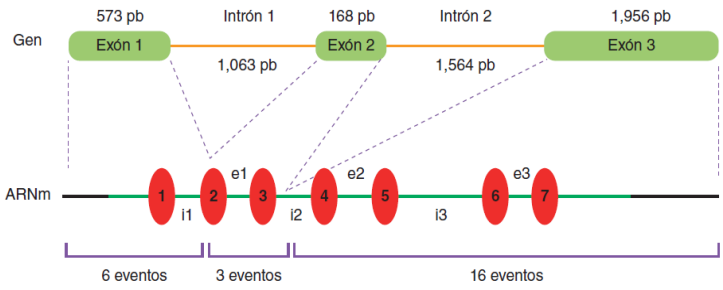


Figura 27. Organización genómica del gen H_3R humano. Se muestran los exones (verde) y los intrones (amarillo). En la representación esquemática del mRNA, se muestra la región codificante (línea verde) con los dominios TM ilustrados en óvalos rojos, y se indican las asas extra e intracelulares. En los corchetes se indican las regiones del mRNA donde tienen lugar los eventos de *splicing* alternativo y su número. (Extraído de García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016).

extiende hasta el inicio del segmento TM 5 estaría involucrada en la actividad constitutiva observada en el H_3R (Arrang et al., 2007; Morisset et al., 2000; Pillot et al., 2002; Rouleau et al., 2002). Muchos de los compuestos originalmente clasificados como antagonistas del H_3R son en realidad agonistas inversos y su uso ha sido crucial para el estudio de la actividad constitutiva del H_3R, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se han detectado varios polimorfismos en la secuencia aminoacídica del H_3R: en el residuo 19 se puede encontrar glutamato o aspartato, en la posición 280 alanina o valina, y en la posición 197 cisteína o tirosina (Hancock et al., 2003). Además, el gen del H_3R, con dos intrones y numerosas variantes de *splicing*, a diferencia de H_1R y H_2R, da lugar a un gran número de isoformas para este receptor con distinta distribución y farmacología (Bakker et al., 2006; Drutel et al., 2001; García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Hancock et al., 2003; Leurs et al., 2005).

Las isoformas del H_3R difieren principalmente en 4 regiones de la proteína y el número posible de isoformas es elevado debido a que muchos eventos de *splicing* tienen lugar simultáneamente en una misma molécula de mRNA (Figura 28) (Tabla 2). La existencia de isoformas del H_3R no es exclusiva del ser humano, sino que también se han descrito para múltiples especies como rata, ratón y cobaya. Hasta la fecha, se conocen 20 isoformas humanas distintas para el H_3R, aunque no todos sus patrones de expresión diferencial. Esta distribución heterogénea de las isoformas de H_3R sugiere que la regulación histaminérgica es específica de las isoformas y podría ser importante para explicar diferencias entre diversas áreas del cerebro (Cogé et al., 2001; Drutel et al., 2001; Esbenshade et al., 2006; Wellendorph et al., 2002). Muchas de ellas no son funcionales, ya sea por carecer de las regiones implicadas en la unión del agonista (TM3, TM5, TM6, TM7) o de las regiones necesarias para la transducción de señales (bucles intracelulares 2 y 3 y CTD), pero al menos 5 isoformas han mostrado funcionalidad en sistemas heterólogos: $H_3R(445)$, $H_3R(453)$, $H_3R(415)$, $H_3R(373)$ y $H_3R(365)$. Estas isoformas son homólogas en sus regiones TM, y difieren en los ATDs y CTDs y/o en el tercer bucle intracelular. Las otras 12 isoformas no unen ligandos y, por lo tanto, no serían funcionales, aunque es necesario su estudio con mayor profundidad (Flock et

Tabla 2. Isoformas del receptor H_3 de histamina humano. Se indican los cambios en el número de aminoácidos con respecto a la isoforma $H_3R(445)$, así como la región en la que se producen (a-d, Figura 28). (Extraído de Leurs et al., 2005).

H_3 receptor isoform	Regions a	b	c	d	Amino acid changes compared to H_3 (445) receptor isoform
H_3 (453)				+8	Eight additional C-terminal amino acids
H_3 (445)					
H_3 (431)		–14			85–98
H_3 (415)			–30		234–263
H_3 (413)			–32		274–305
H_3 (409)	–36				7–42
H_3 (395)	–36	–14			7–42, 85–98
H_3 (379)	–36		–30		7–42, 234–263
H_3 (373)			–80	+8	275–354, and eight additional C-terminal amino acids
H_3 (365)			–80		275–354
H_3 (351)		–14	–80		85–98, 275–354
H_3 (340)			–80 –25		a275–354, 392–416
H_3 (329)	–36		–80		7–42, 275–354
H_3 (329)			–116		227–342
H_3 (326)			–119		197–315
H_3 (309)			–144	+8	274–417, and eight additional C-terminal amino acids
H_3 (301)			–144		274–417
H_3 (293)	–36		–116		7–42, 227–342
H_3 (290)	–36		–119		7–42, 197–315
H_3 (200)					Introduction of 30 additional amino acids after residue 171 owing to a frameshift and an alternative stop codon

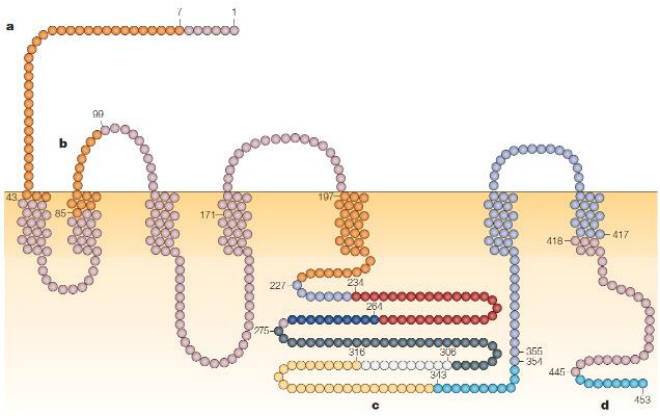


Figura 28. Estructura del H_3R humano. Las distintas isoformas del H_3R difieren principalmente en 4 regiones de la proteína (a-d) y el *splicing* alternativo ocurre de forma independiente en estas 4 regiones. (Extraído de Leurs et al., 2005).

al., 2015; García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Kuramasu et al., 2011). La isoforma descrita por Lovenberg y colaboradores, la $H_3R(445)$, es la isoforma predominante, junto con la $H_3R(365)$, y la mejor caracterizada hasta el momento. Muchas isoformas difieren de la $H_3R(445)$ en grandes deleciones en uno o más segmentos aminoacídicos (Figura 28). Entre ellas, las que presentan deleciones en el tercer bucle intracelular han recibido un mayor interés por la implicación de este dominio del receptor en el acoplamiento a la proteína G (Cogé et al., 2001; Drutel et al., 2001). Hay que destacar que las isoformas de H_3R difieren notablemente en sus perfiles farmacológicos, incluyendo las potencias de sus agonistas, sus propiedades señalizadoras y su actividad constitutiva (Hancock et al., 2003; Leurs et al., 2005; Morisset et al., 2000; Wellendorph et al., 2002).

Hasta la fecha, las características farmacológicas y funcionales de las isoformas del H_3R sólo han sido evaluadas mediante su expresión en sistemas celulares heterólogos. Las isoformas que han resultado funcionales también se acoplan a Gαi o Gαo para inhibir la formación de cAMP, aunque la isoforma $H_3R(445)$ parece acoplarse preferencialmente a las vías de señalización de las ERKs, lo que resulta relevante en el hipocampo, ya que esta isoforma se expresa en mayor cantidad en comparación con el resto de isoformas y que se ha descrito la importancia de la vía de las ERKs en la plasticidad sináptica (Chepkova et al., 2012; Cohen-Matsliah et al., 2007; Luo et al., 2017; Masini et al., 2017; Passani et al., 2004; Thiels and Klann, 2001; Thomas and Huganir, 2004). Además de favorecer la plasticidad neuronal, la activación de la vía de las ERKs se ha relacionado con la promoción de la supervivencia celular, lo que confiere al H_3R propiedades neuroprotectoras (Kukko-Lukjanov et al., 2006). Recientemente se han descrito los mecanismos moleculares que subyacen a la activación de las ERKs por parte de H_3R en cultivos primarios corticales y se ha observado que ésta puede producirse por activación de PLC/PKC, por activación de PLD o mediante la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), además de demostrarse que las subunidades βγ juegan un papel importante, mientras que se trata de un proceso independiente de β-arrestinas (Lai et al., 2016).

Diversos estudios han reportado diferencias notables en la isoforma $H_3R(365)$, que indicarían que podría ser el autorreceptor en humanos, mientras que el equivalente a la $H_3R(413)$ parece serlo en rata (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Gbahou et al., 2012). Además, la respuesta a diferentes agonistas mostró que éstos fueron entre 5-27 veces más potentes para activar la isoforma $H_3R(365)$ que la $H_3R(445)$, mientras que los antagonistas selectivos fueron entre 5-6 veces menos potentes para la isoforma $H_3R(365)$ que para la $H_3R(445)$ (Bongers et al., 2007a; Wellendorph et al., 2002). En cuanto a la eficacia en la inhibición de la formación de cAMP, los agonistas fueron más eficaces con el receptor $H_3R(445)$ (80% de inhibición, comparada con el 44% observado con la isoforma $H_3R(365)$), mientras que los agonistas inversos mostraron mayor eficacia con la isoforma $H_3R(365)$, hecho que indica y reafirma una mayor actividad constitutiva de la isoforma más corta (Arrang et al., 2007; Hancock et al., 2003; Rouleau et al., 2002). En comparación con la isoforma $H_3R(445)$, la $H_3R(365)$ tiene una expresión abundante en el hipotálamo, donde se localizan las neuronas histaminérgicas, lo que concordaría con su función como autorreceptor, modulando la síntesis y liberación de histamina, así como la frecuencia de disparo de las neuronas histaminérgicas (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016). También han sido descritos fenómenos de selectividad funcional entre estas dos isoformas. En un estudio reciente, se reveló que la isoforma $H_3R(365)$ es completamente incapaz de estimular la fosforilación de GSK3β, mientras que para $H_3R(445)$ se trata de un punto final robusto en su señalización (Bongers et al., 2007b; Riddy et al., 2017). Este hallazgo abre la posibilidad de que ciertas isoformas de H_3R, que son coexpresadas *in vivo*, puedan ser consideradas como dianas farmacológicas selectivas. Debido a que estas dos isoformas se expresan abundantemente en el neoestriado, también sería interesante determinar si ambas

subpoblaciones de MSNs expresan las dos isoformas o si éstas están segregadas, como ocurre con los receptores D_1R y D_2R de dopamina (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016).

En rata, las isoformas H_3R_D, H_3R_E y H_3R_F, que carecen del segmento TM7 necesario para la unión del agonista, reducen de manera importante la expresión en la membrana celular de la isoforma H_3R_A (equivalente a la $H_3R(445)$ en humanos) cuando son coexpresadas en células COS-7, actuando así como isoformas dominante-negativas (Bakker et al., 2006). Esto pone de manifiesto la posibilidad de que ocurra lo mismo con las isoformas humanas no funcionales, es decir, que su función se manifieste regulando la expresión y funcionalidad de las isoformas funcionales en el SNC. Así, se ha propuesto que la heteromerización entre isoformas funcionales de H_3R con isoformas no funcionales que carecen del dominio F(X)6LL, necesario para interactuar con proteínas accesorias que median el destino del receptor a la membrana plasmática, podría explicar la retención observada del receptor H_3R en el RE (Bongers et al., 2007c). De la misma forma, la interacción directa de las isoformas de H_3R, funcionales o no, con otros receptores en la célula, puede afectar a sus propiedades de señalización (Nieto-Alamilla et al., 2016).

La presencia de varias isoformas funcionales del H_3R, con heterogeneidad en sus características farmacológicas y de señalización, así como con patrones de expresión diferencial en las distintas áreas cerebrales, sugiere la existencia de una fina regulación de la función del SNC por parte del sistema histaminérgico. Es necesario profundizar más en la comprensión de esta diversidad farmacológica y funcional de las isoformas de H_3R para el posible futuro diseño de fármacos selectivos para éstas, así como en la comprensión de sus proteínas reguladoras, para poder así actuar de forma más específica sobre las alteraciones histaminérgicas que se manifiestan en múltiples patologías del SNC.

1.4.5 Interacciones del receptor H_3 con otros GPCRs: heterómeros D_1R-H_3R

Uno de los múltiples mecanismos de regulación de los GPCRs consiste en la interacción directa del receptor con otras proteínas, las cuales pueden tener funciones señalizadoras, adaptadoras o incluso tratarse de otros receptores también expresados en la célula. Cabe recordar que la interacción que se da por hetermerización de receptores presenta diferentes componentes: uno de ellos son los posibles cambios farmacológicos, es decir, cambios en las características de unión de un receptor ante la presencia o activación del receptor adyacente; el otro componente es la interacción funcional, es decir, posibles cambios observados a nivel de segundos mensajeros (Ferré et al., 2007, 2014). En el caso del H_3R, se ha descrito su interacción con otros GPCRs y las primeras evidencias se obtuvieron para el receptor D_2R en estudios funcionales del núcleo estriado. Por un lado, se detectó en esta región una alta densidad postsináptica de H_3Rs en las neuronas GABAérgicas dinorfinérgicas y encefalinérgicas, es decir las que expresan los receptores D_1 y D_2, respectivamente (Pillot et al., 2002; Ryu et al., 1994). Además de esta codistribución de los receptores H_3 y D_2, se describió que el bloqueo de H_3R producía una profunda supresión de la expresión de *c-fos* inducida por haloperidol en el estriado dorsolateral y que antagonistas de H_3R suprimían los efectos del haloperidol en otras regiones del estriado (Hussain et al., 2002). Por otro lado, también se publicó que en estriado de rata los efectos de agonistas sobre los receptores H_3 y D_2 son aditivos y que ligandos de un receptor no modifican el efecto del ligando del otro receptor, lo que parecía indicar que estos receptores no interactúan a través de su acoplamiento a proteína G (Humbert-Claude et al., 2007). Sin embargo, en el mismo estudio se observó una hiperactividad de las neuronas histaminérgicas y dopaminérgicas en la esquizofrenia, y la activación aditiva de los receptores H_3 y D_2 sugería que ambos receptores cooperan para generar algunos síntomas esquizofrénicos. En conjunto, estos resultados no

aportaban evidencias de una interacción directa entre los dos receptores. Poco después, en nuestro grupo de investigación, se demostró la existencia de heterómeros entre H_3R y D_2R en células vivas y en estriado de muestras cerebrales, así como la existencia de interacciones antagónicas funcionales entre los receptores H_3 y los receptores D_1 y D_2 (Ferrada et al., 2008). A nivel farmacológico, se detectó una modulación alostérica de manera que los agonistas de H_3R provocan un claro cambio hacia la derecha en la curva de competición del antagonista de D_2R [^{3}H]YM-09151-2 *versus* el agonista del receptor D_2-*like* quinpirole. El análisis de las curvas de competición, en presencia y ausencia del agonista de H_3R RAMH, indican que este efecto se debe a una disminución de las afinidades del D_2R por su agonista, concretamente de unas 50 veces para el estado de alta afinidad y de unas 4 veces para el estado de baja afinidad. También en este trabajo, se presentaron evidencias de la posible interacción física entre estos receptores mediante la técnica de BRET en células vivas y se estudió el efecto de distintos tratamientos sobre la actividad locomotora de ratones reserpinizados, ya que representan un buen modelo *in vivo* para el estudio de la función de D_1R y D_2R sin la influencia de dopamina endógena. Así, se observó que el agonista selectivo de H_3R imetit inhibe, mientras que el antagonista de H_3R tioperamida potencia la activación locomotora inducida por el agonista de D_1R SKF 38393 y el agonista de D_2R quinpirole, siendo este efecto máximo cuando ambos receptores se coactivan. Estos resultados sugieren que la interacción antagónica entre H_3R y D_2R probablemente juega un papel modulador clave de la función de la neurona GABAérgica encefalinérgica (Ferrada et al., 2008).

En cuanto a las interacciones antagónicas observadas entre los receptores H_3 y D_1 en aquel estudio, concuerdan con las descritas en cortes estriatales de rata por Arias-Montaño y colaboradores en su análisis de la liberación de GABA y por Alfaro-Rodriguez y colaboradores sobre la liberación de dopamina (Alfaro-Rodriguez et al., 2013; Arias-Montaño et al., 2001). A diferencia del H_3R, el D_1R se acopla a Gαs/olf estimulando a la AC, de manera que los efectos opuestos sobre esta enzima ya predecían efectos antagónicos entre H_3R y D_1R en la neurona GABAérgica dinorfinérgica a nivel de señalización. De hecho, se ha demostrado también en cortes estriatales de rata que la activación de H_3R inhibe eficientemente la activación de la AC mediada por D_1R, aunque no encontraron evidencias de una interacción directa entre estos receptores (Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004). Así, las interacciones funcionales antagónicas podían explicarse a nivel de producción de cAMP pero no podía descartarse la existencia de una interacción molecular entre ambos receptores, de manera similar a como lo hacen H_3R y D_2R (Ferrada et al., 2008). Por ello también en nuestro grupo de investigación se comprobó y demostró, utilizando una línea celular de neuroblastoma (SK-N-MC), que los receptores D_1R y H_3R son capaces de formar heterómeros (Ferrada et al., 2009). En primer lugar, la heteromerización se demostró mediante la técnica de BRET en células transfectadas transitoriamente con ambos receptores y mediante ensayos de unión de radioligandos en células que los expresaban de forma estable, en los que se observó que un agonista específico de H_3R produce la desaparición de la cooperatividad en la unión del agonista de D_1R a su receptor, así como un cambio significativo en la afinidad del receptor D_1R por su agonista. A nivel de señalización también se encontraron características indicativas de esta heteromerización, como que en células que coexpresan ambos receptores se produce un cambio en la señalización del D_1R a nivel de proteína G, pasando de Gαs a Gαi, a la cual los receptores H_3R ya están unidos y pueden activar, disminuyendo el nivel de cAMP de la célula. Cuando se analizó la vía de las MAPKs se observó que el H_3R no era capaz de activar esta vía a no ser que se coexpresara con el D_1R, lo que indica que los heterómeros formados por D_1R y H_3R constituyen un dispositivo molecular único para dirigir la señalización dopaminérgica e histaminérgica hacia la vía de las MAPKs. Análogamente, cuando se coexpresó el D_1R con una versión mutada del H_3R que no es capaz de unir agonista ni de señalizar, se observó que la activación del D_1R por su agonista específico no activaba la vía de las MAPKs (Ferrada et al., 2009). Estos resultados sugieren que la

señal de D_1R a través de la vía de las MAPKs, en células que coexpresan ambos receptores, está mediada por H_3R, por lo que son consistentes con las evidencias que indican que en la activación de un homo- o un heterodímero interviene un único protómero y que en esta activación se produce una interacción dinámica entre los protómeros, tal como se demostró para dímeros del receptor metabotrópico de glutamato (Brock et al., 2007; Hlavackova et al., 2005). Por último, en aquel trabajo también se evidenció un antagonismo cruzado o *cross*-antagonismo entre D_1R y H_3R de manera que, no sólo el antagonista de cada uno de los receptores, sino que también el antagonista del receptor adyacente es capaz de contrarrestar el efecto de la activación de D_1R o de H_3R. Así, el antagonista de una de las unidades del heterómero D_1R-H_3R puede inducir cambios conformacionales en la otra unidad del heterómero y bloquear señales específicas originadas en el heterómero (Ferrada et al., 2009).

En un trabajo posterior también realizado en nuestro grupo de investigación, se quiso comprobar si los heterómeros D_1R-H_3R se expresaban en tejidos nativos para poder establecer posteriormente su significado fisiológico. Para ello, se comprobó si las características bioquímicas propias del heterómero, es decir, su *fingerprint* molecular que había sido determinado en sistemas heterólogos, también se podía observar en muestras de tejido nativo. Utilizando cortes de estriado de rata, se analizó el efecto de antagonistas de ambos receptores sobre la activación de la vía de las MAPKs mediada por agonistas de D_1R y/o H_3R, y se detectó el *cross*-antagonismo que previamente había sido detectado en células, demostrándose así de forma indirecta la existencia de heterómeros D_1R-H_3R en el estriado de rata (Moreno et al., 2011a). Además, en ratones KO para el D_1R no se detectó señalización mediada por H_3R a través de la vía de las MAPK, lo que también concuerda con los resultados observados en células. Debido a que había sido demostrado previamente que el H_3R se expresa en el estriado tanto en neuronas que contienen D_1R como en las que contienen D_2R (Pillot et al., 2002), y a que en este trabajo Moreno y colaboradores observaron marcaje de la fosforilación de ERK1/2 mediada por H_3R únicamente en neuronas que también expresaban D_1R pero no en las que expresaban D_2R, se concluyó que la activación de la vía de las MAPKs por parte de H_3R únicamente se producía en neuronas GABAérgicas de la vía directa, pero no en cambio en las neuronas de la vía indirecta. Por último, se analizó cual era la respuesta sobre la fosforilación de ERK1/2 tras activar conjuntamente ambos receptores y se observó que ésta era menor a la obtenida cuando los receptores eran activados por separado (Moreno et al., 2011a). De este modo, lo que probablemente ocurre en las neuronas MSNs de la vía directa es que, en ausencia o a muy bajas concentraciones de dopamina, la histamina puede promover señalización por MAPKs mediante la activación de los receptores H_3R, mientras que cuando los dos neurotransmisores están presentes, la activación de las MAPKs en la vía estriatonigral es reprimida. Recientemente, Rapanelli y colaboradores han descrito con más detalle la interacción entre H_3R y D_1R o D_2R en el estriado, confirmando *in vivo* que la histamina modula la señalización de D_1R, tanto a nivel bioquímico, a través de las vías que activan MAPK/MSK/rpS6 y las que activan Akt/GSK3β, (pero no en cambio a través de la vía cAMP/PKA), como a nivel de organismo, disminuyendo la actividad locomotora inducida por la activación de D_1R, hecho que se demuestra por primera vez en animales intactos no reserpinizados (Rapanelli et al., 2016). Todos estos hallazgos manifiestan que el heterómero D_1R-H_3R trabajaría como un procesador que integra señales mediadas por dos neurotransmisores distintos, la dopamina y la histamina, capaz de procesar las distintas señales, incluso las que recibe en un mismo intervalo de tiempo. Debido a que la vía de las MAPKs es considerada crítica en la consolidación de las sinapsis (Cohen-Matsliah et al., 2007; Thiels and Klann, 2001; Thomas and Huganir, 2004), estos resultados muestran que no sólo la dopamina sino que también la histamina juega un papel importante en la neuroplasticidad dependiente de MAPKs en la vía estriatonigral.

Estudios realizados en otras regiones cerebrales también sugieren una posible heteromerización de D_1R y H_3R. En la corteza prefrontal medial, se ha detectado que el H_3R colocaliza en interneuronas GABAérgicas con el D_1R, así como en las MSNs del NAc y en las terminales nerviosas de estas dos áreas (González-Sepúlveda et al., 2013). Una evidencia de esta heteromerización, en este caso funcional, la aporta un estudio sobre la capacidad ansiogénica de la histamina realizado en amígdala basolateral de ratas, en que se observó que D_1R y D_2R estarían claramente implicados, ya que el tratamiento con antagonistas específicos para estos receptores previene el efecto ansiogénico inducido por la histamina (Bananej et al., 2012). Además, un estudio reciente sobre el comportamiento asociado a la ingesta en pollos reveló que los efectos hipofágicos provocados por la histamina están mediados por D_1R y son atenuados por antagonistas de D_1R, mientras que el D_2R no estaría implicado; por otro lado, los efectos hipofágicos inducidos por la dopamina están mediados por H_1R y H_3R, pero no por H_2R ni H_4R. Estos resultados sugieren que el heterómero D_1R-H_3R estaría implicado en el control de la ingesta y reafirman que el H_1R también es partícipe de esta regulación (GhandForoushan et al., 2017).

Por otro lado, el grupo de Arias-Montaño recientemente ha demostrado la existencia de otro heterómero formado por la interacción del H_3R con el receptor de adenosina A_{2A} en el estriado de rata (Márquez-Gómez et al., 2017). Resultados previos en el mismo grupo de investigación, ya evidenciaban una interacción funcional entre estos receptores en el GP, mediante la cual la activación con agonistas de H_3R es capaz de contrarrestar la acción facilitadora de $A_{2A}R$ sobre la liberación de GABA desde las proyecciones estriatopalidales (Morales-Figueroa et al., 2014). Para demostrar la heteromerización, se emplearon múltiples técnicas, como la CoIP, BiFC, técnicas de unión a radioligandos y ensayos funcionales de movilización de Ca^{2+}. A partir de sus resultados y de publicaciones previas sobre la distribución de estos receptores, se hipotetiza que el heterómero H_3R-$A_{2A}R$ tiene una localización presináptica en las MSN encefalinérgicas del estriado que conforman la vía indirecta, pero no en las dinorfinérgicas que no expresan $A_{2A}R$, así como en las terminales corticoestriatales que conectan con las MSN de la vía directa. Además se sugiere su importancia en la modulación presináptica de la transmisión corticoestriatal glutamatérgica y de la intraestriatal GABAérgica (Márquez-Gómez et al., 2017). A nivel de señalización molecular, se ha visto que $A_{2A}R$ y H_3R mantienen sus vías de señalización canónicas en el heterómero ($G\alpha s$ y $G\alpha i$, respectivamente) y que tras la coestimulación del heterómero el H_3R facilita la señalización de $A_{2A}R$. Esto supondrá efectos diversos en función de la neurona en la que se exprese el heterómero, de manera que en las proyecciones corticoestriatales la activación únicamente de $A_{2A}R$ o de H_3R supone un aumento o una disminución de la liberación de glutamato respectivamente, mientras que una coactivación en estas terminales facilita aún más la liberación de glutamato, resultando en una hiperestimulación de las MSN de la vía directa. En cambio, en las terminales colaterales de las MSN encefalinérgicas, ambos receptores inhiben la liberación de GABA cuando son activados por separado. Esto puede deberse al hallazgo previamente reportado de que $A_{2A}R$ muestra una dualidad funcional en estas neuronas, pudiendo activar tanto $G\alpha s$ como $G\alpha q$ (Gubitz et al., 1996). Así, se cree que la coactivación de ambos receptores en el heterómero H_3R-$A_{2A}R$ en estas neuronas inhibirá aún más la liberación de GABA, facilitando así la activación de las MSN de la vía directa (Márquez-Gómez et al., 2017). Este efecto observado al coestimular el heterómero H_3R-$A_{2A}R$ puede tener relevancia en el tratamiento de desórdenes como el autismo o el trastorno obsesivo-compulsivo, en los que se han reportado alteraciones en la transmisión glutamatérgica corticoestriatal y en la excitabilidad de las MSNs (Naaijen et al., 2017).

Debido a que se ha demostrado que otros neurotransmisores, como el GABA, la dopamina, la serotonina y la noradrenalina pueden ser liberados por las neuronas histaminérgicas (Flik et al., 2015; Yanovsky et al., 2011), es muy importante tener en cuenta la acción de otros

neurotransmisores cuando se manipula la actividad de las neuronas histaminérgicas. Este factor, sumado a la gran complejidad intrínseca que exhibe el sistema histaminérgico, sugiere que estudios futuros requieren de más especificidad para vislumbrar la actividad histaminérgica en función de la localización celular y del tipo de receptor activado. Para lograrlo, una opción que permite una aproximación temporal y espacial más precisa es la optogenética combinada con el uso de ratones KO condicionales, como es el caso del modelo, ya disponible, para HDC (HDC-Cre) (Deisseroth, 2015; Kim et al., 2017; Williams et al., 2014). Asimismo, la exploración de proteínas intracelulares que interactúen directamente con los receptores de histamina y el estudio de su función, ayudarían a profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de estos receptores. Por último, el desarrollo de fármacos que se unan selectivamente a ciertos receptores/isoformas/heterómeros en tipos celulares específicos supondría un abordaje terapéutico preciso, con mayor eficacia y/o menor incidencia de efectos secundarios (Hu and Chen, 2017).

1.5 Sistema glutamatérgico

1.5.1 El glutamato como neurotransmisor

Aunque se sabe hace más de 75 años que el glutamato tiene efectos en el SNC, no fue hasta 1984 que fue reconocido como neurotransmisor (Fonnum, 1984). Pese a su naturaleza ubicua, el nivel extracelular de glutamato está altamente regulado, hecho que permite su función como el neurotransmisor excitatorio mayoritario en el SNC, además de sus implicaciones metabólicas como aminoácido. Debido a que el glutamato es el principal mediador de la plasticidad neuronal, incluyendo tanto la potenciación a largo plazo como la eliminación celular, es crucial que este neurotransmisor esté presente en las concentraciones y sinapsis adecuadas y en el momento oportuno. Del mismo modo, las células deben presentar una correcta sensibilidad al glutamato, hecho que viene determinado por los subtipos de receptores de glutamato expresados, y el nivel de glutamato extracelular debe ser disminuido a un ritmo apropiado. Dado que no hay enzimas extracelulares capaces de degradar el glutamato, bajas concentraciones de éste requieren de una recaptación celular eficiente. Esta recaptación es catalizada por la familia de proteínas transportadoras EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporter*), localizada en la membrana celular de astrocitos y neuronas y que presentan una gran densidad alrededor de las sinapsis, de manera que el glutamato no unido a receptores pueda ser secuestrado rápidamente al interior celular (Tzingounis and Wadiche, 2007; Vandenberg and Ryan, 2013).

El glutamato es un aminoácido no esencial que no cruza la BBB, de manera que todo el glutamato neuronal se sintetiza a partir de glucosa o bien a partir de glutamina subministrada por las células gliales en la llamada sinapsis tripartita (Figura 29). Como todos los aminoácidos, el glutamato tiene un esqueleto de carbono derivado de la glucosa, la cual cruza la BBB a través de los pies astrocíticos y, una vez en el interior celular, se metaboliza por la vía de la glicólisis a piruvato en el citosol (Olsen and Sonnewald, 2015). El piruvato entra en la mitocondria y participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por el cual se genera α-cetoglutarato que posteriormente puede recibir un grupo amino por transaminación desde una molécula dadora, como por ejemplo los aminoácidos leucina y aspartato o el neurotransmisor GABA (Pellerin and Magistretti, 2004). Una vez sintetizado, el glutamato puede tener múltiples destinos. Por un lado, puede servir de precursor metabólico de GABA por la acción de la enzima glutamato descarboxilasa, así como de derivados aminoacídicos como el antioxidante glutatión (Niciu et al., 2012). Por otro lado, el glutamato no metabolizado debe ser redistribuido hacia las mitocondrias o bien hacia vesículas sinápticas mediante transportadores específicos y distintos a los de la membrana plasmática. Los transportadores encargados de introducir el glutamato en vesículas, una vez sintetizado o bien recaptado, son los VGLUT (*vesicular glutamate transporter*) (Liguz-

Lecznar and Skangiel-Kramska, 2007), cuya actividad depende del gradiente electroquímico de protones generado por la ATPasa vesicular. Tras el estímulo adecuado, las vesículas se fusionarán con la membrana plasmática gracias a proteínas SNARE y el glutamato será liberado al espacio intersináptico, donde podrá tanto unirse a receptores específicos como ser recaptado por los EAAT, ambos presentes en la membrana de la neurona postsináptica y de los astrocitos. Una vez en el interior del astrocito, el glutamato es transformado a glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa, que puede ser empleada para la síntesis proteica o bien liberada por los transportadores tipo N y finalmente captada por las neuronas cercanas para completar el ciclo glutamato-glutamina (Zhou and Danbolt, 2014).

Por lo que respecta a la liberación de glutamato al espacio extracelular, aunque la mayoría de estudios se han centrado en la liberación sináptica desde las terminales nerviosas por exocitosis de vesículas sinápticas, éste no resulta ser el único mecanismo (Danbolt, 2001). Así, otros modos de liberación reportados implican canales aniónicos (Wang et al., 2013), intercambiadores cisteína-glutamina (Baker et al., 2002) e incluso se reportó la capacidad de los astrocitos de liberar glutamato por exocitosis (Bezzi et al., 2004). Este último aspecto generó gran controversia, ya que los astrocitos tienen altas concentraciones de la enzima glutamina sintetasa, que cataliza la degradación de glutamato a glutamina, por lo que el nivel de glutamato es relativamente bajo, y además recientemente se refutó el hecho de que los astrocitos expresen transportadores de glutamato vesiculares (Li et al., 2013). Aun así, esto no excluye la posibilidad de que los astrocitos liberen glutamato, ya que podrían hacerlo por otros mecanismos no vesiculares, como los comentados anteriormente (Zhou and Danbolt, 2014) o mediante exocitosis lisosomal de microvesículas SLMV (*synaptic-like microvesicle*) (Li et al., 2008). De hecho, el glutamato liberado desde los astrocitos, así como otras moléculas señalizadoras como la D-serina, son considerados actualmente como gliotransmisores, ya que pueden participar de forma directa en la transmisión sináptica (Guillamón-Vivancos et al., 2015). Otra consecuencia importante de las conexiones astrocito-neurona consiste en la capacidad de los primeros de promover o reducir la liberación de neurotransmisores por parte de las neuronas en las sinapsis en que participan, mediante el Ca^{2+} que respectivamente liberan o captan durante su generación de ondas de Ca^{2+}. Así, la implicación de los astrocitos en la sinapsis ha ido adquiriendo cada vez más importancia, no sólo por su papel de soporte metabólico sino también por su capacidad de modular la transmisión sináptica, incluida la inducción de la sincronía neuronal mediada por glutamato (Fellin et al., 2004).

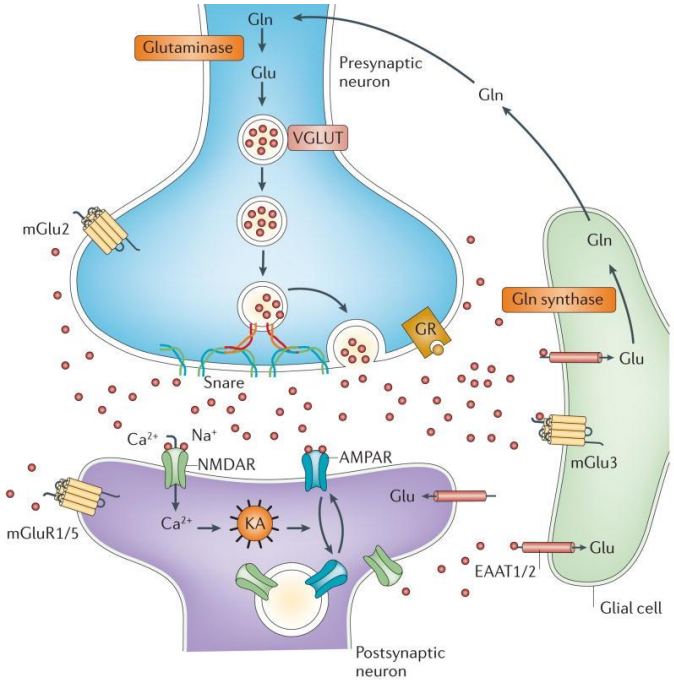


Figura 29. Sinapsis glutamatérgica tripartita. Se muestran las principales proteínas implicadas en el metabolismo, transporte y señalización del glutamato. (Extraído de Popoli et al., 2011).

A nivel cerebral, existen múltiples vías glutamatérgicas implicadas en funciones tan distintas como el control motor y el procesamiento de la información límbica y cognitiva (Figura 30) (Schwartz et al., 2012; Smith, 2005). Las neuronas glutamatérgicas que se originan en la

neocorteza se comunican con otras neuronas corticales (Figura 30, e) y también penetran hacia regiones cerebrales más profundas del cerebro medio (tálamo, núcleo estriado i NAc) (Figura 30, b y d) y del tronco encefálico (núcleo rafe, locus cerúleo, VTA y SN) (Figura 30, a). Por otro lado, otro grupo de neuronas glutamatérgicas que se originan en el tálamo inervan neuronas piramidales de la corteza, constituyendo la única vía ascendente glutamatérgica hacia la corteza (Figura 30, c). Las sinapsis glutamatérgicas axodendríticas tienen la particularidad de ser fácilmente reconocibles mediante microscopía electrónica debido a una engrosada apariencia de la membrana postsináptica. Estas densidades postsinápticas (PSD) tienen un grosor de unos 50 nm y están formadas por conglomerados proteicos de receptores de membrana, proteínas de andamiaje y segundos mensajeros efectores (Niciu et al., 2012).

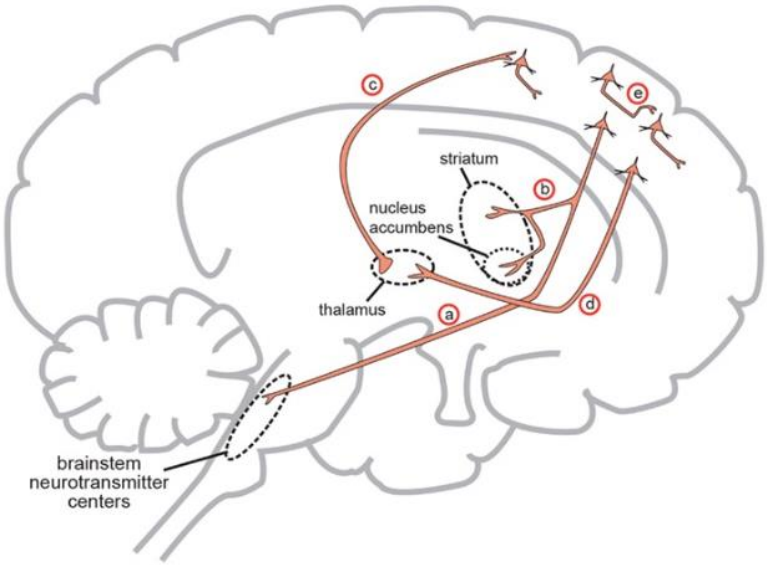


Figura 30. Principales circuitos glutamatérgicos en el cerebro humano. (Extraído de Schwartz et al., 2012).

El fino control de la neurotransmisión glutamatérgica supone un coste energético elevado y requiere de múltiples procesos reguladores y elevados niveles de consumo de oxígeno y glucosa. Se ha descrito que alteraciones en los sistemas de regulación del nivel de glutamato extracelular puede tener efectos deletéreos, como ocurre con un exceso de liberación de glutamato y la consecuente inducción de hiperexcitabilidad en la neurona postsináptica hasta el punto de causar excitotoxicidad y muerte celular (Lau and Tymianski, 2010; Zhou and Danbolt, 2014). La excitotoxicidad inducida por glutamato, particularmente en el hipocampo, se ha relacionado con una disminución de la regeneración neuronal y de la ramificación dendrítica, dando lugar al impedimento del aprendizaje espacial (Cortese and Phan, 2005). Otros trabajos también han relacionado la alteración de la recaptación del glutamato de la sinapsis con una reducción en la sensibilidad a la recompensa, un conocido síntoma de la depresión (Bechtholt-Gompf et al., 2010). Por último, en cuanto a la muerte celular, cabe destacar que se ha relacionado la excitotoxicidad por glutamato con procesos neurodegenerativos en enfermedades crónicas como la esclerosis lateral amiotrófica, la AD, la esclerosis múltiple o la HD (Lau and Tymianski, 2010; Lewerenz and Maher, 2015).

1.5.2 Receptores de glutamato: estructura, clasificación y expresión diferencial.

Los receptores de glutamato se expresan ampliamente en el cerebro y en la medula espinal, tanto en neuronas como en la glía. Se trata de receptores muy variados y altamente complejos, que pueden ser clasificados en dos grandes categorías, los ionotrópicos y los metabotrópicos, cada

una formada por tres subtipos distintos (Figura 31). Los receptores metabotrópicos de glutamato son GPCRs que se activan únicamente por unión de ligando, mientras que los ionotrópicos son canales iónicos también sensibles a variaciones en el voltaje y su acción es mucho más rápida que los metabotrópicos (Niciu et al., 2012).

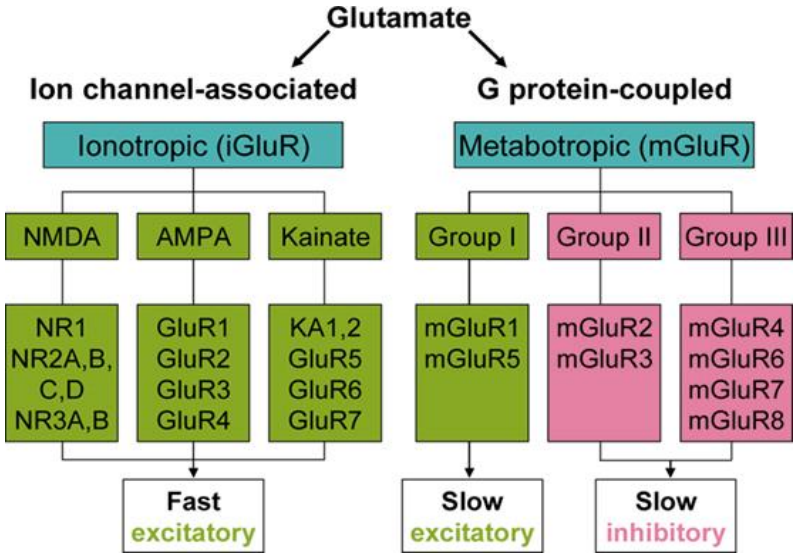


Figura 31. Clasificación de los receptores glutamatérgicos. (Extraído de Popoli et al., 2011).

Por lo que respecta a los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), hasta la fecha se han identificado 8 miembros (mGluR1-8) y clasificado en 3 grupos en función de su homología, unión a segundos mensajeros y farmacología, aunque existe aún mayor diversidad debido a la existencia de variantes de *splicing*, que presentan variaciones de secuencia principalmente en el CTD del receptor (Ferraguti and Shigemoto, 2006). Se trata de GPCRs y por lo tanto su estructura contiene 7 segmentos transmembrana y bucles intracelulares capaces de interactuar con proteínas G. Los receptores del grupo I (mGluR1 y 5) se acoplan predominantemente a proteína Gαq/11, mientras que los grupos II (mGluR2 y 3) y III (mGluR4, 6, 7 y 8) se acoplan a proteína Gαi. Además de la activación de segundos mensajeros intracelulares a través de la subunidad Gα, también pueden señalizar por la acción directa de las subunidades βγ y la consecuente activación de canales iónicos. Aunque los mGluRs pueden mediar la transmisión sináptica a través de la inducción de potenciales de excitación postsinápticos lentos, generalmente ejercen un papel más modulador, regulando la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad (Kew and Kemp, 2005). En cuanto a su expresión, exceptuando el mGluR6 cuya expresión esta confinada a la retina, los demás se expresan en la periferia y en el SNC, tanto en neuronas como en la glía, existiendo en algunos casos patrones de expresión diferencial espaciales y temporales. En cuanto a los mGluRs neuronales, los del grupo I se localizan principalmente en la membrana postsináptica, mientras que los del grupo II y III lo hacen presinápticamente en las terminales axonales, donde pueden regular la liberación de glutamato (Cartmell and Schoepp, 2000). Como característica estructural a destacar, todos los mGluRs presentan un enorme ATD extracelular bilobulado que contiene el sitio de unión a glutamato. Se cree que para que sean funcionales, los mGluRs forman homodímeros y que, en ausencia de ligando, los dominios extracelulares bilobulados están separados y presentan una conformación abierta, mientras que tras la unión de un agonista adoptan una conformación cerrada que se traduce en la transducción de la señal intracelular (Kunishima et al., 2000; Tsuji et al., 2000).

En relación con los receptores ionotrópicos, se trata de complejos proteicos tetraméricos que presentan una gran diversidad funcional según la composición de sus subunidades y de su perfil de expresión (Hansen et al., 2010b; Traynelis et al., 2010). Las subunidades que los componen presentan una estructura general común, con cuatro dominios distintos: ATD, de unión a ligando (LBD), transmembrana (TMD) y CTD (Figura 32). Una vez se une a glutamato, el receptor ionotrópico sufre cambios conformacionales que permiten un flujo inmediato de Na^+ y otros iones hacia el interior celular y de K^+ hacia el exterior, provocando una despolarización de la membrana postsináptica capaz de inducir una transducción de la señal. Existen 3 tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, que reciben su nombre del ligando al cual se unen específicamente: el receptor de NMDA (NMDAR), el receptor de ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPAR) y el receptor del ácido kaínico (KAR). Además, presentan propiedades y distribución distintas, aunque todos participan mediando la acción del glutamato en el aprendizaje y la memoria mediante la modificación de las propiedades del canal y favoreciendo la transmisión glutamatérgica y la expresión génica (Barco et al., 2006). Se cree que los NMDARs son los principales receptores implicados en la plasticidad neuronal, proceso responsable no sólo del aprendizaje y la memoria sino también de la recuperación después del daño cerebral, y cuyos mecanismos básicos son la neurogénesis, el refinamiento de la fuerza sináptica dependiente de actividad y la eliminación de sinapsis (Paoletti et al., 2013). Los NMDARs se expresan en neuronas y también en astrocitos (Lee et al., 2010) y están constituidos por el ensamblaje de 4 subunidades por combinación de 6 subtipos distintos (NR1, 2A, 2B, 2C, 2D, 3A, 3B), que para que sean funcionales como mínimo deben contener 2 subunidades NR1, las cuales a su vez presentan numerosos eventos de *splicing* (Figura 33). Los NMDARs tienen la particularidad de presentar una elevada permeabilidad al paso de iones Ca^{2+}, además de Na^+, hacia el interior celular, hecho que puede tener efectos tanto beneficiosos como tóxicos para la célula (Hardingham and Bading, 2003). Además, estos receptores se pueden considerar detectores de coincidencia, ya que para su activación y apertura es necesaria tanto la unión de glutamato y el co-agonista glicina/D-serina, como la despolarización de la membrana postsináptica, hecho que permite la salida del ion Mg^{2+} que a niveles fisiológicos se encuentra bloqueando el canal (Kew and Kemp, 2005; Lau and Tymianski, 2010; Mayer et al., 1984; Niciu et al., 2012; Qian and Johnson, 2002). Los AMPARs están constituidos por la combinación de 4 subunidades (GluR1-4) y únicamente requieren la unión de glutamato para su activación. Presentan distinta especificidad al paso de cationes en función de las subunidades que lo componen, con la particularidad de que la subunidad GluR2 no permite el paso de iones Ca^{2+} (Geiger et al., 1995). Fisiológicamente, los AMPAR regulan la rápida excitación requerida para eliminar el bloqueo del ion Mg^{2+} de los NMDAR cercanos y por ello presentan una distribución principalmente postsináptica (Kew and Kemp, 2005; Lau and Tymianski, 2010; Niciu et al., 2012). Por último, los KAR se forman por la combinación de 5 subunidades distintas (GluR5-7 y KA1-2) y también requieren únicamente la unión de glutamato para activarse, con la diferencia de que son mayoritariamente impermeables a Ca^{2+} y se localizan tanto pre- como postsinápticamente. A nivel presináptico, hay estudios que indican una inhibición de la liberación de glutamato (Frerking et al., 2001), mientas que otros han observado una estimulación (Schmitz et al., 2000). A nivel postsináptico, al igual que los receptores AMPA, los receptores kainato

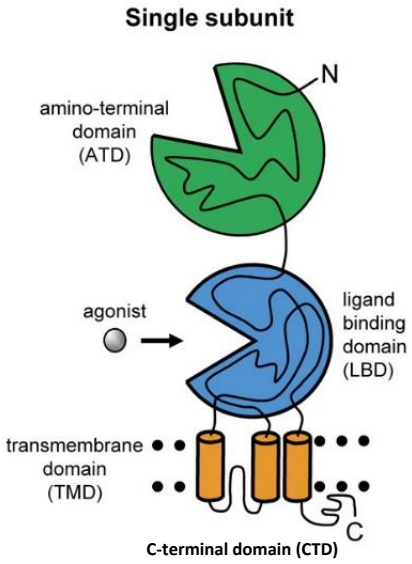


Figura 32. Estructura esquemática de una de las subunidades que componen un receptor ionotrópico de glutamato. (Extraído de Hansen et al., 2010b)

permiten el desbloqueo por parte de iones Mg^{2+}de los NMDARs (Kew and Kemp, 2005; Lau and Tymianski, 2010).

En 1992 se descubrió la existencia de una cuarta familia de receptores ionotrópicos huérfanos, que incluye los receptores delta 1 (GluD1R) y delta 2 (GluD2R), que presentan cierta homología (17-25%) con los receptores ionotrópicos de glutamato, pero no son capaces de activarse por la unión de AMPA, kainato, NMDA ni glutamato (Lomeli et al., 1993; Schmid and Hollmann, 2008; Yamazaki et al., 1992). Su estudio ha llevado más tiempo que los demás receptores ionotrópicos, pero recientemente se han dilucidado algunas de sus implicaciones funcionales, sobre todo para el GluD2R (Khan, 2017). En el SNC, el GluD1R se expresa de forma difusa por el cerebro anterior durante etapas tempranas del desarrollo, mientras que en el cerebro adulto su expresión es muy baja, y se desconoce por el momento cuál es su función (Lomeli et al., 1993). El GluD2R se expresa predominantemente en las células de Purkinje del cerebelo y es imprescindible para un correcto desarrollo y función del cerebelo (Kashiwabuchi et al., 1995). Se cree que el GluD2R actúa principalmente como un organizador de la sinapsis mediante su interacción con proteínas pre- y postsinápticas de anclaje y señalizadoras (Uemura et al., 2010), aunque también ha sido reportada su activación y apertura por asociación con receptores metabotrópicos mGlu1R, hecho que resulta crítico en las corrientes glutamatérgicas lentas en las sinapsis entre fibras paralelas y células de Purkinje (Ady et al., 2014). Actualmente, se desconoce si pueden formar receptores heteroméricos con subunidades de otros receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Khan, 2017).

Tanto los receptores ionotrópicos como los metabotrópicos interactúan con proteínas postsinápticas a través de su CTD intracelular. Cabe destacar que la proteína PSD-95 (*postsynaptic density protein of 95 kDA*) ha mostrado ser capaz de estabilizar la sinapsis mecánicamente mediante la interacción con las proteínas presinápticas neuroligina y β-neurexina (Irie et al., 1997; Levinson et al., 2005). Además, la PSD-95 hace de puente entre los NMDARs y el citoesqueleto, uniéndose al CTD de la subunidad NR2 del receptor y a la proteína α-actinina, que a su vez está unida a los filamentos de actina, contribuyendo así a la morfogénesis de la espina dendrítica. A nivel postsináptico, la PSD-95 también se une a efectores como la calmodulina y la CaMKII, la cual a su vez promueve la translocación de receptores AMPA y kainato desde compartimentos intracelulares hacia la PSD. En cambio, los receptores metabotrópicos de glutamato se sitúan más bien peri-y extrasinápticamente debido a sus interacciones con otras proteínas de andamiaje de similar distribución (Niciu et al., 2012).

1.5.3 Relevancia fisiológica del receptor NMDA

La composición de las subunidades que componen un NMDAR es plástica, ya que se ve modificada por cambios en la actividad sináptica, durante el desarrollo y en situaciones patológicas, y variada, de manera que pueden ensamblarse un gran número de receptores con distintas propiedades biofísicas, farmacológicas y señalizadoras (Figura 33). Actualmente, existe un interés creciente en dilucidar si subtipos de receptor con composiciones específicas de sus subunidades llevan a cabo funciones concretas en el SNC, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (Lau and Zukin, 2007; Paoletti et al., 2013). En el 2014 dos grupos de investigación publicaron, de forma prácticamente simultánea e independiente, la estructura cristalina del NMDAR de rata (Karakas and Furukawa, 2014) y de rana (Lee et al., 2014a), con la combinación de subunidades GluN1a/GluN2B y la unión de un modulador alostérico negativo. Las diferencias de tamaño entre las distintas subunidades que pueden conformar un NMDAR se deben principalmente a diferencias en la longitud de su CTD, el cual está implicada en el tráfico del receptor y en el acoplamiento a cascadas de señalización (Figura 33, a) (Traynelis et al., 2010).

Como se ha comentado anteriormente, los NMDARs funcionan necesariamente como ensamblajes heterotetraméricos, que típicamente están constituidos por un mínimo de dos subunidades GluN1 que pueden asociarse con dos subunidades GluN2 o bien con una mezcla de GluN2 y GluN3 (Papadakis et al., 2004; Sanz-Clemente et al., 2013). La subunidad GluN1 posee un sitio de unión a glicina, en el que también se une la D-serina, y la GluN2 un sitio para glutamato, de manera que un receptor funcional posee dos sitios de unión para cada co-agonista. En el caso de que el receptor no esté constituido por GluN2 sino únicamente por GluN1 y GluN3, comportará que éste no pueda responder a glutamato ya que la subunidad GluN3 no posee ningún sitio de unión para este aminoácido, pero sí para glicina, hecho que convierte al complejo en un receptor de glicina excitatorio. En general, la presencia de subunidades GluN3 disminuye las corrientes iónicas generadas por la activación de receptores heteroméricos GluN1/GluN2 y, además de ser insensibles a glutamato, también lo son al bloqueo por Mg^{2+}, razones por las que se ha propuesto que este tipo de receptores podría intervenir en la activación de las llamadas sinapsis silenciosas del NMDAR (Chatterton et al., 2002). En los NMDARs, a diferencia de los AMPARs y los KARs, el ATD contribuye al control de apertura y cierre del canal y contiene múltiples sitios de unión a moduladores alostéricos específicos para cada subunidad. Algunos ejemplos de moduladores alostéricos los constituyen el zinc, capaz de causar inhibición del canal; múltiples poliaminas, cuyos efectos dependen del compuesto y de las subunidades que componen el receptor; y los protones, cuya acción fisiológicamente supone un cambio en la actividad de los NMDARs en función del pH extracelular. Además del ATD, el CTD también representa una gran diferencia con respecto los AMPARs y KARs ya que los NMDARs pueden interactuar con proteínas de la PSD implicadas en facilitar la señalización intracelular que regula la neuroplasticidad (Lau and Tymianski, 2010; Traynelis et al., 2010).

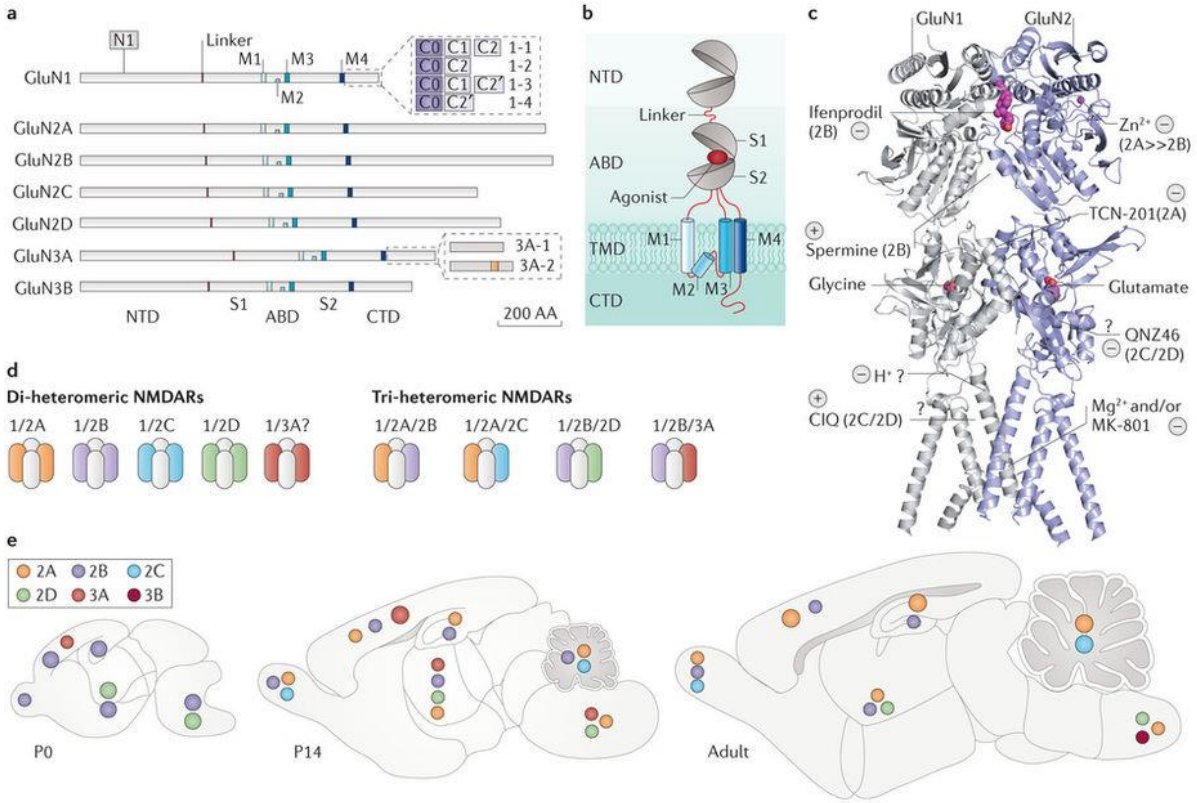


Figura 33. Diversidad, estructura y expresión de las subunidades del receptor NMDA. (a) Siete genes codifican para las distintas isoformas (GluN1, GluN2A–D y GluN3A-B) y su diversidad se ve aumentada por procesos de *splicing* alternativo en las subunidades GluN1 y GluN3A. (b,c) Todas las subunidades comparten una arquitectura modular similar. Se muestran algunos moduladores alostéricos específicos de subunidad. (d) Muestra de las distintas poblaciones de NMDARs di- y triheteroméricos que se cree que existen en el SNC. (e) Perfil de expresión de las subunidades del NMDAR durante el desarrollo en el cerebro de ratón (P=día postnatal). (Extraído de Paoletti et al., 2013).

La subunidad GluN1 está codificada por un solo gen y presenta 8 isoformas producidas por *splicing* alternativo, con diferencias en la longitud de los CTDs y en el tráfico del receptor (Horak and Wenthold, 2009). La expresión de las subunidades GluN1 es bastante ubicua, con algunas diferencias específicas de isoforma, y se expresa a partir de los 14 días del desarrollo embrionario y hasta la edad adulta. Algunas de las diferencias de expresión entre isoformas GluN1 también se han visto inducidas por situaciones patológicas, como la observada mediante un modelo experimental de seccionamiento del nervio óptico, en que se veía aumentada la expresión de la subunidad GluN1-b y esto aportaba a las células afectadas una ventaja significativa para su supervivencia (Kreutz et al., 1998). Así, la subunidad GluN1 no sólo es necesaria para la correcta expresión del receptor en la membrana plasmática, existiendo discrepancias acerca de si ocurre mediante la formación inicial de homodímeros GluN1 por puentes disulfuro o bien mediante el previo ensamblaje de heterodímeros que contienen GluN1 (Horak and Wenthold, 2009; Papadakis et al., 2004; Schüler et al., 2008), sino que además la expresión diferencial de sus isoformas tendría consecuencias funcionales importantes, aunque aún son necesarios muchos estudios al respecto.

Con respecto a las subunidades GluN2, están codificadas por cuatro genes diferentes y muestran distintos perfiles de expresión espaciotemporales, apreciándose un incremento de la relación GluN2A/GluN2B durante el desarrollo postnatal temprano y hasta la edad adulta, acompañado de una gran disminución de la expresión de GluN2D (Figura 33, e) (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994; Yashiro and Philpot, 2008). Las GluN2 son las subunidades determinantes de la diversidad funcional de los NMDARs, influyendo directamente en su sensibilidad, conductancia, cinética de desactivación y de desensibilización y, por lo tanto, en la duración de las corrientes postsinápticas excitatorias (Erreger et al., 2005; Gielen et al., 2009). Además de determinar la funcionalidad del receptor, también controlan su transporte a la membrana plasmática y distribución en los compartimentos sinápticos, a través de sus CTDs intracelulares. En cuanto a su transporte a la membrana plasmática, debido a que tanto homómeros de GluN2 como de GluN3 quedan retenidos en el RE y que homómeros de GluN1 presentan corrientes de muy baja amplitud, se cree que las secuencias de retención en el RE (también presentes en GluN1) podrían enmascararse mutuamente al asociarse las subunidades entre sí en el RE, dando lugar a receptores funcionales en la membrana plasmática (Hawkins et al., 2004; Traynelis et al., 2010). En cuanto a la distribución en los compartimentos sinápticos, la subunidad GluN2A parece ser más abundante en las sinapsis, mientras que la GluN2B está presente tanto en dominios sinápticos como extrasinápticos. Debido a que los receptores que contienen GluN2B tienen tasas de difusión más elevadas que los que contienen subunidades GluN2A, y a que la incorporación en la sinapsis de receptores con GluN2A requiere de actividad sináptica, se observa un enriquecimiento de subunidades GluN2A en las sinapsis maduras (Barria and Malinow, 2002). Las diferencias en la tasa de difusión de estas subunidades se deben a su interacción con otras proteínas. Las subunidades GluN2 interactúan por sus CTDs con proteínas con dominio PDZ, como la PSD-95, que no sólo facilitan la asociación de los NMDARs en clústeres en la superficie celular, sino que, igual que sucede con algunas isoformas de la subunidad GluN1, pueden contribuir a su estabilidad en la sinapsis al enmascarar dominios de internalización. En cambio, las GluN2B son fosforiladas como consecuencia de una actividad sináptica y esto conlleva la disrupción de la interacción con PSD-95 y la disminución de la expresión de GluN2B en la sinapsis (Chung et al., 2004; Goebel-Goody et al., 2009; Kornau et al., 1995). Por último, también existen diferencias entre estas subunidades por su sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+}, siendo mayor el bloqueo en receptores con subunidades GluN1a+GluN2A/B que con GluN1a/GluN2C/D, por lo que serán activados a distintos rangos de potencial de membrana (Jatzke et al., 2002).

Las subunidades GluN3A y GluN3B también están codificadas por genes distintos, existiendo eventos de *splicing* alternativo para la GluN3A en rata. Muestran perfiles diferenciales de expresión ontogénica, observándose para la GluN3A un máximo en etapas postnatales tempranas y un posterior declive progresivo, y para la GluN3B un perfil antagónico, con un lento incremento durante el desarrollo y una elevada y restringida expresión en las neuronas motoras en el adulto (Figura 33, e) (Kehoe et al., 2013; Pachernegg et al., 2012). Las subunidades GluN3A parecen limitar la maduración sináptica prematura, actuando como un freno molecular durante el desarrollo. En el cerebro adulto, se cree que actúan como un mecanismo dominante-negativo en las sinapsis inactivas, disminuyendo las corrientes de Ca^{2+} e impidiendo la plasticidad sináptica, que acabará provocando la retracción y eliminación de la espina dendrítica. Además, su distribución fuera de las PSDs, incluidos los astrocitos perisinápticos, les sitúa en una posición estratégica para participar en las interacciones entre neuronas y células gliales en las sinapsis tripartitas (Kehoe et al., 2013).

Por lo tanto, la expresión específica de las subunidades GluN2B, GluN2D y GluN3A en etapas tempranas del desarrollo sugiere que son importantes para la sinaptogénesis y maduración sináptica, mientras que en el cerebro adulto, en que predomina la expresión de GluN2A y GluN2B, éstas parecen tener un papel central en la función sináptica y la plasticidad. Además de su papel central durante el desarrollo, y como se ha comentado anteriormente, los NMDARs están implicados en mediar la plasticidad sináptica y los efectos tóxicos provocados por el glutamato, tanto en eventos agudos como en enfermedades crónicas tales como AD, PD, HD y procesos de adicción. La disfunción de los NMDARs puede deberse a múltiples causas, como alteraciones en la expresión de las subunidades o bien en el tráfico, localización o actividad del receptor, pudiendo ser deletérea no sólo su hiperfunción (provocando un exceso de entrada de Ca^{2+} y muerte celular) sino también su hipofunción (Tabla 3) (Carvajal et al., 2016; Hopf, 2017; Lin et al., 2014; Milnerwood et al., 2010; Paoletti et al., 2013).

Con respecto a los efectos tóxicos mediados por los NMDARs, en los últimos años se han unificado dos hipótesis para explicar la causalidad de la toxicidad por glutamato: la que propone que está asociada a la subunidad GluN2B y la que propone que está asociada a la localización extrasináptica de los NMDARs (Parsons and Raymond, 2014). Así, la activación de NMDARs sinápticos induce la expresión de genes que promueven la supervivencia y la plasticidad, mientras que la activación de NMDARs extrasinápticos promueve la expresión de genes pro-apoptóticos (Hardingham and Bading, 2010; Zhang et al., 2007), y los mecanismos de señalización que controlan la distinta localización de los NMDARs son dependientes del estado de fosforilación de GluN2B (Chung et al., 2004; Goebel-Goody et al., 2009). La activación de NMDARs sinápticos implica la fosforilación de proteínas ERK1/2, Jacob y finalmente el factor de transcripción CREB, mientras que los extrasinápticos no inducen fosforilación de ERK1/2, por lo que la proteína Jacob no fosforilada es translocada al núcleo pero no es capaz de inducir la fosforilación de CREB, de manera que la fosforilación de Jacob por parte de ERK1/2 permite discernir entre estas dos vías de activación contrapuestas (Karpova et al., 2013). Además de inducir la expresión de genes pro-apoptóticos, la elevación excesiva del Ca^{2+} intracelular también promueve la lipoperoxidación de la membrana plasmática, el RE y la mitocondria, que acaba induciendo daños en la ATPasa Na^+/K^+ y en los transportadores de glucosa y glutamato, perturbando la homeostasis iónica y comprometiendo el abastecimiento de ATP (Flores-Soto et al., 2012; Mattson et al., 2000). Esta lipoperoxidación se acaba produciendo en última instancia por la producción de especies reactivas como el óxido nítrico y los radicales superóxido. Estudios recientes han evidenciado que el óxido nítrico puede tanto actuar como neuromodulador, potenciando la LTP, como inducir muerte celular (Dawson and Dawson, 2018; Philippu, 2016; Wang et al., 2005).

Tabla 3. Contribución de las alteraciones en subunidades del NMDAR al desarrollo de enfermedades neurológicas. (Extraído de Paoletti et al., 2013).

Disease indications	Key NMDAR-subunit related alterations	Therapeutic treatments
Cerebral ischaemia and traumatic brain injury	Excessive activation of NMDA receptors (NMDARs), especially extrasynaptic GluN2B-containing receptors, owing to increased extracellular glutamate levels. Hyperactivation of NMDARs leads to neuronal death	• GluN2B-selective antagonists • Peptides disrupting GluN2B-interacting partners
Pain	GluN2B-containing receptors are majorly implicated, and alterations include overexpression and altered phosphorylation state of GluN2B. GluN2A-containing receptors can also be involved	GluN2B-selective antagonists
Alzheimer's disease	Activation of GluN2B-containing NMDARs mediates amyloid-β (Aβ)-induced alterations in synaptic plasticity and synapse loss, enhanced production of Aβ- and tau-induced excitotoxicity	NMDAR antagonist (memantine) or GluN2B-selective antagonists
Huntington's disease	Activation of extrasynaptic GluN2B-containing NMDARs increases mutant huntingtin protein-induced excitotoxicity	NMDAR antagonists or GluN2B-selective antagonists
Parkinsons's disease (dyskinesia)	Enhanced synaptic GluN2A expression and redistribution of GluN2B-containing receptors from synaptic to extrasynaptic locations	• GluN2B-selective antagonists • Potential interest for interventions targeting GluN2A subunits
Depression	Inhibitors of NMDARs, in particular GluN2B-containing receptors, induce rapid (hours) and sustained (days) reduction in depressive symptoms	NMDAR antagonists (ketamine) or GluN2B-selective antagonists
White matter injury	NMDAR activation leads to oligodendrocyte damage and loss of the myelin sheath. Specific involvement of GluN2C and/or GluN3A subunits	Potential interest for GluN2C- or GluN3A-selective antagonists
Autism spectrum disorders	Either reduced or enhanced NMDAR function is implicated. Mechanisms are unclear and there is no clear subunit specificity	Potential interest for NMDAR antagonists or NMDAR potentiators
Cognitive impairments	Reduced expression of NMDARs, especially GluN2B-containing receptors, correlates with decline in cognitive functions	Potential interest for NMDAR potentiators
Schizophrenia	Reduced NMDAR presence and/or activity, probably in GABAergic inhibitory neurons, which leads to an imbalance in neural network activity. Suggestions for a preferential loss of GluN2A-containing receptors	• NMDAR potentiators • D-serine, glycine and glycine transporter 1 inhibitors • Potential interest for GluN2A-selective potentiators
Anti-NMDAR encephalitis	Anti-NMDAR antibodies lead to reduced NMDAR density and impaired synaptic plasticity. Specific dispersal of GluN2A subunits from synaptic sites	Potential interest for NMDAR potentiators

Con respecto a la implicación de los NMDARs en la plasticidad sináptica, se ha observado que la actividad neuronal puede generar formas persistentes de plasticidad sináptica, como la LTP y la LTD. Estas formas de plasticidad son necesarias para la retención de nueva información en redes neuronales activadas y hasta la fecha se conocen tres principales mecanismos implicados: la difusión lateral de NMDARs, la exocitosis y endocitosis de NMDARs y la despolimerización de actina (Figura 34). Para prevenir una posible saturación de la LTP o la LTD, hecho que conllevaría una dificultad para discriminar nuevos eventos y almacenar información, así como una posible excitotoxicidad en el caso de la LTP, existen mecanismos que regulan el grado de LTP o LTD que puede ser inducido. A este mecanismo de regulación se le ha llamado metaplasticidad, ya que se trata de una regulación plástica de la propia plasticidad neuronal. Existen diversos mecanismos de metaplasticidad, que puede ser heterosináptica y por lo tanto inducida por moléculas señalizadoras intercelulares, incluidas catecolaminas, GABA, Ach,

citoquinas y hormonas, o bien homosináptica, mediante la propia actividad neuronal que en un momento dado es capaz de inducir cambios en la sinapsis de manera que su capacidad en un futuro de exhibir LTP o LTD se ve alterada. En el caso del NMDAR, la metaplasticidad homosináptica incluye un cambio en la composición de sus subunidades GluN2A y GluN2B y la consecuente alteración en la función del receptor (Figura 35) (Abraham, 2008; Hunt and Castillo, 2012; Yashiro and Philpot, 2008; Zorumski and Izumi, 2012). En las sinapsis con ratios GluN2A/GluN2B bajas, cuando modestas o elevadas cantidades de Ca^{2+} entran a través del NMDAR, éstas tienen una mayor probabilidad de activar CaMKII y promover LTP, ya que la CaMKII se encuentra interactuando con la subunidad GluN2B (Halt et al., 2012; Zhou et al., 2007), mientras que únicamente una estimulación sináptica muy baja será capaz de activar PP2B sin activar suficientemente a CaMKII, permitiendo así la LTD. Por el contrario, en las sinapsis con ratios GluN2A/GluN2B elevadas, la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR es más limitada y será menos probable activar a CaMKII, siendo necesaria una mayor estimulación del NMDAR para promover LTP respecto a LTD (Yashiro and Philpot, 2008).

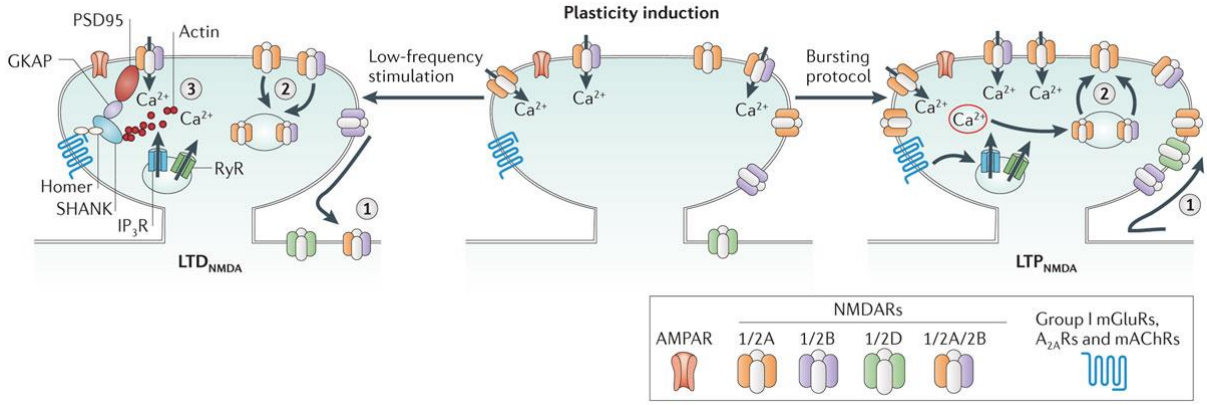


Figura 34. Plasticidad inducida por receptores NMDA en las sinapsis maduras. En el adulto, los NMDARs han mostrado la capacidad de inducir plasticidad sináptica de forma independiente a los receptores AMPA. Tanto la LTP como la LTD requieren de un incremento postsináptico del Ca^{2+} intracelular, el cual proviene tanto de la entrada a través de los NMDARs como de la liberación desde almacenes intracelulares como consecuencia de la activación de receptores metabotrópicos, incluidos los mGluR1s y los D_1Rs. Los principales mecanismos que subyacen a la plasticidad inducida por NMDARs son la difusión lateral (1), la exocitosis y endocitosis (2) y la despolimerización de actina (3). (Extraído de Paoletti et al., 2013).

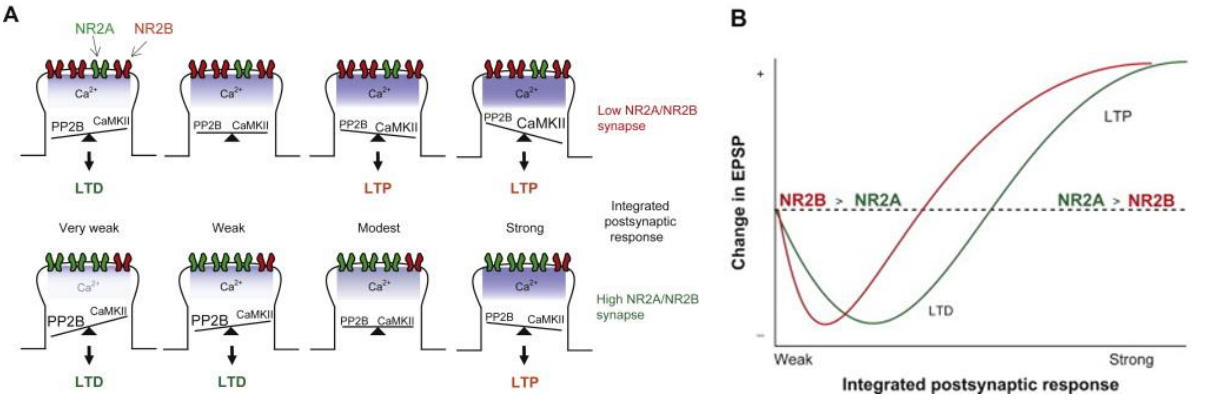


Figura 35. Modelo hipotético de regulación de la plasticidad sináptica por el receptor NMDA. (A) El umbral de inducción de LTP/LTD difiere entre sinapsis que presentan ratios bajas (imagen superior) y elevadas (imagen inferior) de las subunidades GluN2A/GluN2B. En estos dos tipos de sinapsis, una misma frecuencia de estimulación producirá diferentes efectos en la plasticidad sináptica, debido a las diferencias en los niveles relativos de las enzimas PP2B y CaMKII activadas, las cuales promueven LTD y LTP, respectivamente. (B) Esquema que muestra como las subunidades de NMDAR regulan las propiedades de la modificación sináptica. En el eje X se representa la respuesta postsináptica integrada (relacionada con la frecuencia de activación sináptica) y en el eje Y se representa cambios duraderos en la fuerza sináptica. Cuando la ratio GluN2A/GluN2B sináptica es elevada, el umbral para pasar de LTD a LTP se desplaza a la derecha, siendo necesaria una mayor activación para inducir LTP, mientras que cuando la ratio es baja, el paso de LTD a LTP se ve favorecido. (Extraído de Yashiro and Philpot, 2008).

Debido a que la naturaleza heteromérica del NMDAR provee a las neuronas de una gran diversidad de receptores, con diversas propiedades de señalización, es perentorio encontrar compuestos farmacológicos y aproximaciones genéticas que permitan discriminar entre subtipos de receptores (Sanz-Clemente et al., 2013). No hay que olvidar la dualidad existente al activar NMDARs, con posibles efectos neurotóxicos y pro-supervivencia, de manera que su ventana terapéutica deberá ser estrecha. Recientemente se han descubierto nuevos moduladores alostéricos específicos de subunidad, que en un futuro podrían tener implicaciones terapéuticas, aunque aún son necesarios muchos avances en este campo para que se conviertan en tratamientos eficaces (Hackos and Hanson, 2017; Mony et al., 2009; Wang et al., 2017; Zhu and Paoletti, 2015).

1.5.4 Interacción del receptor NMDA con otros receptores: heterómeros NMDAR-D_1R

Como se ha comentado anteriormente, los NMDARs pueden ser modulados por la unión de una gran cantidad de moléculas, como el zinc o múltiples poliaminas, por la fosforilación de su CTD intracelular por múltiples proteínas, que a su vez pueden ser reguladas por otros sistemas neurotransmisores como la dopamina (véase apartado 1.3.4 Receptor D_1R: mecanismos de señalización y Figura 24) (Blank et al., 1997; Greengard et al., 1999), así como por contacto directo con otras proteínas o receptores. Estas interacciones proteína-proteína se producen en diversas regiones del NMDAR y algunas están implicadas en la plasticidad sináptica inducida por NMDARs (Figura 36) (Ladépêche et al., 2013). En cuanto al dominio extracelular ATD, se descubrió que la subunidad GluN1 es capaz de interaccionar con el receptor tirosina quinasa EphrinB (EphB2R), una proteína postsináptica implicada en procesos de migración celular (Dalva et al., 2000). Esta interacción tiene consecuencias importantes en el contenido y función de NMDARs en la sinapsis, conllevando la acumulación y estabilización de subunidades GluN2B fosforiladas (Nolt et al., 2011). Otras proteínas de gran importancia en la plasticidad sináptica que interactúan con NMDARs por dominios intracelulares son la CaMKII, que como se ha comentado anteriormente es capaz de interactuar con la subunidad GluN2B e inducir LTP (Halt et al., 2012; Zhou et al., 2007), proteínas con dominios PDZ que regulan la distribución de los NMDARs, estabilizándolos en el PSD (Bard and Groc, 2011), así como múltiples receptores (Ladépêche et al., 2013). Se han identificado diversos receptores capaces de interactuar directamente con el CTD del NMDAR, como el receptor ionotrópico alfa-7 nicotínico (α7-nAchR) (Li et al., 2012), el σ_1R (Balasuriya et al., 2013) y también múltiples GPCRs, como el mGluR5a (Perroy et al., 2008), el μOR (Rodríguez-Muñoz et al., 2012), el CB_1R (Rodríguez-Muñoz et al., 2016; Sánchez-Blázquez et al., 2014) y los D_1Rs y D_2Rs (Lee et al., 2002; Liu et al., 2006).

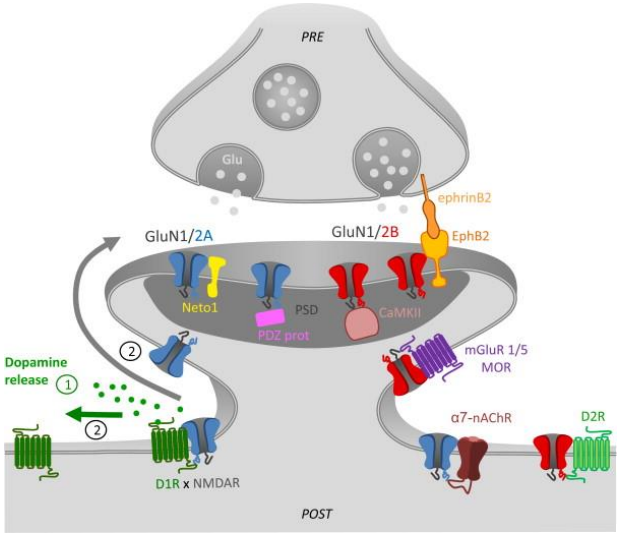


Figura 36. Representación esquemática de las interacciones directas de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAR con otras proteínas en las inmediaciones de la sinapsis glutamatérgica. La unión del D_1R al NMDAR controla el contenido sináptico de ambos receptores y la activación por dopamina (1) induce una redistribución lateral de ambos receptores (2), favoreciendo la localización sináptica del NMDAR. (Extraído de Ladépêche et al., 2013).

La interacción entre el NMDAR y el D_1R, de especial interés en esta Tesis Doctoral por ser objeto de su estudio, fue descrita por primera vez por el grupo de Fang Liu (Lee et al., 2002). Se

demostró que la interacción se daba por la unión de dos segmentos del CTD del D_1R, el t2 y el t3, a las subunidades GluN1 y GluN2A del NMDAR, respectivamente, aunque aún está por determinar si estas dos interacciones pueden darse a la vez entre un único D_1R y un NMDAR, o bien cada protómero del homodímero D_1R-D_1R interactúa con una subunidad del NMDAR. Más adelante, el mismo grupo describió la interacción del D_2R con la subunidad GluN2B, por la que al activar D_2Rs en el estriado se reduce la fosforilación de GluN2B por parte de CaMKII, induciendo una disminución de las corrientes mediadas por el NMDAR (Liu et al., 2006). De forma similar, el ensamblaje entre D_1R y NMDAR en el RE permite que sean dirigidos juntos a la membrana plasmática, hecho que impide la internalización de D_1Rs cuando estos son activados y dirige su tráfico a microdominios de membrana específicos (Fiorentini et al., 2003; Scott et al., 2006). Como consecuencia, otras proteínas potencialmente capaces de competir por la unión a D_1Rs, como la PSD-95, pueden romper la interacción D_1R-NMDAR, anulando así tanto su modulación recíproca como la promoción por parte del NMDAR de la expresión en membrana del D_1R (Zhang et al., 2009). Aunque las interacciones del D_1R con la PSD-95 están implicadas en el tráfico intracelular del receptor, se demostró que no afectan a las dinámicas de superficie ni a la distribución sináptica en neuronas del hipocampo (Ladepeche et al., 2013a).

A nivel funcional, mientras que la interacción D_1R-GluN2A participa en la inhibición de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) mediadas por el NMDAR, de forma independiente de PKA y PKC y mediante la internalización de NMDARs, la activación del NMDA potencia la función de los D_1Rs unidos a GluN1 promoviendo su inserción en la membrana plasmática y consecuentemente su señalización vía cAMP (Pei et al., 2004; Scott et al., 2002). Se cree que esto se consigue mediante la captura en la espina dendrítica de D_1Rs que difunden lateralmente, por parte de NMDARs activados que actúan como andamiaje y permiten la formación de complejos D_1R-NMDAR (Scott et al., 2006). Se quiso comprobar la importancia funcional de esta interacción y, aplicando un péptido sintético que mimetiza la región t2 del D_1R, se consiguió romper la interacción D_1R-GluN1 y resultó en una inhibición de la LTP dependiente de NMDAR en hipocampo de ratón, además de impedir la memoria de trabajo en estos animales (Nai et al., 2010). Otro estudio en el que se consiguió marcar D_1Rs individualmente y realizar un seguimiento por imagen, reveló que los D_1Rs son muy dinámicos en la membrana celular de neuronas hipocampales, pero una fracción de éstos forma clústeres estables junto con NMDARs en las inmediaciones de las sinapsis glutamatérgicas, conformando una reserva a partir de la cual los receptores podrán redistribuirse lateralmente durante las adaptaciones sinápticas (Ladepeche et al., 2013b). El conjunto de estos resultados evidencia que la interacción que se da a nivel de membrana plasmática entre el D_1R y el NMDAR contribuye a los procesos moduladores implicados en la plasticidad y la cognición de manera independiente a las cascadas de señalización, siendo por lo tanto la membrana plasmática el primer escenario de regulación (Wang et al., 2012). El hecho de que mediante la interacción D_1R-NMDAR sea posible regular la difusión lateral de D_1R y NMDAR y con ello la neurotransmisión excitatoria, constituye para la neurona un mecanismo rápido y energéticamente asequible para integrar las señales dopaminérgicas y glutamatérgicas y promover la adaptación sináptica (Ladépêche et al., 2013).

Estudios previos a la elaboración de esta Tesis aportaban evidencias, aunque únicamente funcionales, de una posible interacción entre el NMDAR y el H_3R. Por un lado, en ratones se observó que el antagonista del NMDAR MK-801 potencia la actividad neuronal histaminérgica y que esta potenciación se ve disminuida por el co-tratamiento con antagonistas de H_3R (Faucard et al., 2006). En otro estudio con neuronas corticales de ratón, agonistas de H_3R mostraron un efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad inducida por el tratamiento con dosis elevadas de NMDA, mediante la inducción de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Mariottini et al., 2009). El efecto neuroprotector del H_3R frente a la neurotoxicidad inducida por NMDA también se ha visto con el tratamiento de antagonistas de H_3R, en este caso mediante la

inducción de la liberación de GABA en neuronas corticales de rata (Dai et al., 2007). Sin embargo, en este último estudio se utilizó el compuesto clobenpropit como antagonista de H_3R, del que posteriormente fue publicada su capacidad de unión y también de bloqueo del NMDAR (Hansen et al., 2010a).

1.6 Adicción a la cocaína

1.6.1 El proceso de adicción: circuitos cerebrales implicados

La adicción es una enfermedad crónica, que se caracteriza por una progresión cíclica a través de fases de recuperación y recaída, y puede resultar devastadora, ya que no sólo afecta al individuo adicto, sino también a sus familiares, amigos y en definitiva al conjunto de la sociedad si se tiene en cuenta el gran coste económico que conllevan sus consecuencias, desde los evidentes costes médicos hasta la baja productividad laboral o los crímenes asociados (Koob and Volkow, 2016; Volkow and Morales, 2015). Frecuentemente, la adicción se relaciona con el abuso de sustancias psicoactivas, aunque existen muchos otros tipos que no requieren el consumo de ninguna sustancia, como el sexo, los juegos de azar y otros comportamientos (Joffe et al., 2014). La naturaleza de la adicción ha sido frecuentemente objeto de debate, atribuyendo las causas a una elección personal de estilo de vida o bien a una vulnerabilidad biológica. Actualmente, existen evidencias de ciertas vulnerabilidades genéticas, de manera que los individuos que las poseen, al ser expuestos a estrés crónico o bien sufrir otras condiciones psiquiátricas, tienen un mayor riesgo de acabar teniendo los comportamientos automáticos y compulsivos que caracterizan la adicción (Lerman and Berrettini, 2003). La mayoría de drogas de abuso ejercen sus efectos reforzadores iniciales mediante la activación de circuitos de recompensa cerebrales y, mientras que la experimentación inicial de la droga es mayoritariamente un comportamiento voluntario, el uso continuado de la droga impide la correcta función cerebral, interfiriendo con la capacidad de ejercer autocontrol sobre el consumo de la droga y dejando al cerebro con una mayor sensibilidad al estrés y a los estados de ánimo negativos (Joffe et al., 2014; Volkow and Morales, 2015). Concretamente, las drogas de abuso acaban modulando la expresión de genes implicados en la neuroplasticidad, mediante modificaciones epigenéticas y posiblemente modificaciones en el RNA, perturbando en última instancia las cascadas de señalización y circuitos neuronales implicados en los cambios duraderos asociados a la adicción (Heller et al., 2014; Nestler, 2012; Robison and Nestler, 2011). El conjunto de estos cambios que sufre el cerebro del enfermo lo harán más susceptible a futuras recaídas y, si la adicción no es controlada, el tiempo transcurrido entre cada consumo se acortará, a la vez que las dosis consumidas aumentarán. Esto, junto con el hecho de que para el enfermo el único objetivo pasa a ser el consumo de la sustancia de abuso, llegando a olvidar la necesidad de ingerir alimentos o agua, pueden llevar al sujeto a la muerte.

El proceso de adicción es complejo y se compone de tres fases consecutivas, durante las que se producen alteraciones en tres principales neurodominios: la fase de intoxicación, con iniciación en la VTA, la fase de abstinencia y sus síntomas negativos, con la implicación de la amígdala y el NAc y, por último, la fase de preocupación y anticipación, con la implicación de la corteza prefrontal. Durante la fase de intoxicación, un estímulo considerado previamente neutro puede ser asociado a la disponibilidad de la droga y se promueve la formación del hábito, que promueve la búsqueda de la droga mediante aumentos en la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el circuito de la recompensa (Figura 37) (Joffe et al., 2014; Koob and Volkow, 2016). La vía mesocorticolímbica o de la recompensa es una de las vías dopaminérgicas del cerebro y constituye el mecanismo cerebral que proporciona placer al sujeto frente a una acción concreta. Se trata de un circuito fundamental para asegurar la supervivencia del individuo, ya que al activarse aporta una sensación de placer y bienestar que resulta suficiente para que el individuo

desee repetir la conducta, mediante la asociación positiva con la acción que ha inducido a su activación. Como se ha comentado anteriormente, tres dominios distintos de este circuito se ven afectados por la adicción de manera progresiva, desde la VTA hasta la corteza prefrontal y pasando por el sistema límbico, en el que el NAc constituye una interfaz motora-límbica capaz de conectar procesos motivadores con acciones motoras (Morrison et al., 2017). Es importante tener en cuenta que las neuronas dopaminérgicas pueden emitir descargas de dos formas distintas, tónicamente o bien de forma fásica como consecuencia de la activación de estas neuronas, lo que conlleva la liberación de una elevada cantidad de dopamina (Grace et al., 2007). Bajo la condición basal de descarga tónica, los D_2Rs están parcialmente estimulados por dopamina para mantener un nivel basal de comunicación celular, mientras que los D_1Rs se activarán principalmente cuando las neuronas dopaminérgicas pasen a tener una actividad eléctrica fásica (Ellenbroek, 2013).

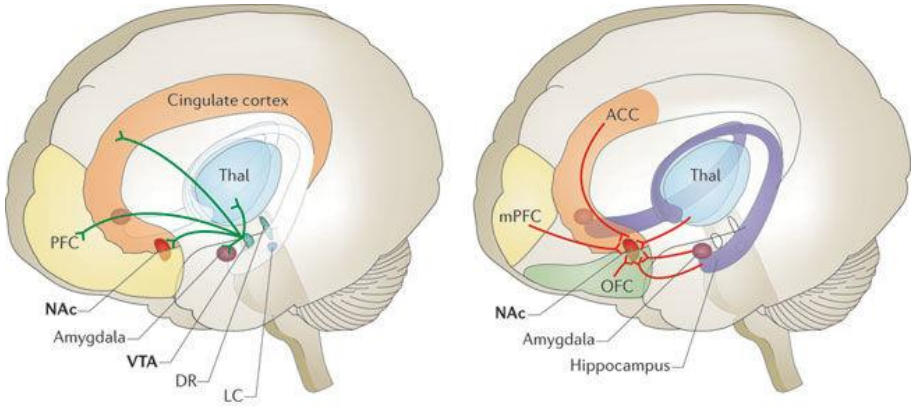


Figura 37. Circuitos de recompensa en el cerebro humano. El cerebro de la izquierda muestra las proyecciones neuronales que se originan en la VTA y liberan dopamina en la corteza prefrontal, el NAc y otras regiones límbicas. En el cerebro de la derecha se indican las regiones glutamatérgicas importantes en la recompensa, las cuales envían sus proyecciones excitatorias al NAc. (DR=rafe dorsal; LC=locus cerúleo; mPFC=corteza prefrontal medial; OFC=corteza orbitofrontal; ACC=corteza cingulada anterior; Thal=tálamo). (Extraído de Robison and Nestler, 2011).

Aunque la dopamina es el neurotransmisor predominante en el circuito de la recompensa, otros neurotransmisores como GABA y glutamato resultan esenciales para la neuroplasticidad que se da durante el desarrollo de la adicción, necesaria para la asociación positiva con ciertas conductas motivadoras y por lo tanto con la persistencia de la adicción (van Huijstee and Mansvelder, 2014; Jay, 2003; Liang et al., 2014). Se ha descrito que, tras múltiples exposiciones a la droga, en las últimas fases de la plasticidad sináptica la remodelación de circuitos glutamatérgicos en la corteza prefrontal juega un papel clave en el mantenimiento de la adicción y que estas modificaciones pueden persistir hasta la edad adulta, causando una perdurable vulnerabilidad a la recaída (van Huijstee and Mansvelder, 2014). Por otro lado, hay evidencias de que el sistema histaminérgico también juega un papel en adicción, en este caso inhibidor, sobre diversos efectos provocados por las drogas de abuso. Por ejemplo, se ha visto que la cocaína interfiere con la actividad de las neuronas histaminérgicas de los núcleos tuberomamilares (Nath and Gupta, 2001) y que provoca un aumento de la concentración cerebral tanto de histamina como de histamina-N-metil transferasa, resultados que indican que las neuronas histaminérgicas están implicadas en el control de la recompensa, aunque se ha visto que existe un control diferencial en función del subtipo de receptor de histamina activado (Brabant et al., 2010). Tanto en el NAc como en el estriado dorsal, núcleos esenciales en la vía de la recompensa, se expresa una gran densidad de H_3Rs (Pillot et al., 2002), los cuales son capaces de regular presinápticamente la liberación de otros neurotransmisores, entre ellos la dopamina, y de modular la señalización tanto de D_1R como de D_2R por su interacción a nivel postsináptico (Ferrada et al., 2008, 2009; Moreno et al.,

2011a). El conjunto de estos resultados sugiere que fármacos histaminérgicos, especialmente dirigidos al H_3R, pueden tener un efecto terapéutico en trastornos de adicción (Brabant et al., 2010). Aunque existen resultados muy favorables del uso de antagonistas/agonistas inversos de H_3R para el tratamiento de la adicción al alcohol, en el caso de psicoestimulantes como la cocaína se han reportado algunos resultados desfavorables, debido seguramente a que se han probado compuestos con un grupo imidazol en su estructura química, pudiendo existir interacciones farmacocinéticas por su inhibición del citocromo P-450, el cual también metaboliza los psicoestimulantes. Por ello, son necesarios nuevos estudios con fármacos antagonistas de H_3R de nueva generación para comprobar su efectividad con drogas de abuso psicoestimulantes (Ellenbroek and Ghiabi, 2014; Panula and Nuutinen, 2013).

La VTA consiste en un grupo heterogéneo de neuronas agrupadas en distintos núcleos en la base del mesencéfalo, adyacente a la SN (Oades and Halliday, 1987; Phillipson, 1979). La separación anatómica entre estas dos estructuras resulta algo ambigua, aunque sí se observan diferencias evidentes en sus proyecciones. Las neuronas de la VTA proyectan hacia numerosas áreas del cerebro, como la habénula lateral, el NAc o la corteza prefrontal, y están implicadas en las funciones cognitivas, la motivación, la recompensa, la adicción a drogas y las emociones, así como en distintos desórdenes neurológicos, como AD (Bariselli et al., 2016; De Marco and Venneri, 2018; Morales and Margolis, 2017). En la VTA, las neuronas dopaminérgicas representan un 55-65% del total (German and Manaye, 1993), pero no son las únicas implicadas en los procesos adaptativos relacionados con la motivación y la recompensa. Estudios recientes han detectado la existencia en la VTA de poblaciones neuronales que co-liberan dopamina y glutamato, dopamina y GABA, o glutamato y GABA (Root et al., 2014; Stuber et al., 2010; van Zessen et al., 2012). En esta región los receptores dopaminérgicos tienen un papel crucial, y sin embargo coexisten con otros GPCRs, como el receptor de CRF, implicado principalmente en la gestión del estrés, el receptor de orexina, involucrado en el apetito y en el sistema cerebral del sueño-vigilia, el receptor de grelina, la hormona del hambre, o con receptores moduladores como σ_1R y σ_2R, que juegan un papel importante en los mecanismos de adicción a las drogas de abuso, concretamente, a la cocaína.

En el circuito de la recompensa y en respuesta a una acción motivadora, las neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el NAc y la corteza prefrontal actúan liberando dopamina y glutamato (Tecuapetla et al., 2010). Como se ha comentado anteriormente, estos neurotransmisores inician respuestas de adaptación conductual (sensibilización) promoviendo la neuroplasticidad, reforzándose así conexiones neuronales que involucran esa conducta y permitiendo que, si en un futuro se repite la misma situación, el organismo emita una respuesta más rápida. Al llegar al NAc, la señal conduce a una modulación de la conducta motivacional, que también se verá influenciada por las señales aferentes procedentes de amígdala, hipotálamo, hipocampo y corteza prefrontal, afinando así aún más la respuesta y preservando las conductas que han generado un estado positivo (Turner et al., 2018). Del NAc proyectan, a su vez, neuronas GABAérgicas hacia la VTA, hecho que permite establecer una inhibición en sentido inverso para modular el sistema (Yang et al., 2018). Una vez que los estímulos de recompensa asociados a cocaína están consolidados, es el estriado dorsal el que juega un papel central. Es decir, se supone que se pasa progresivamente de una búsqueda motivada por una recompensa (conducta dependiente del NAc) a hábitos estímulo-respuesta que dependen del estriado dorsal (Everitt and Robbins, 2005, 2013). Finalmente, la corteza prefrontal, que a su vez mantiene conexiones con la corteza motora, recibe conexiones aferentes dopaminérgicas de la VTA y proyecta hacia el NAc y la VTA. La corteza prefrontal constituye un lugar de asociación de funciones de mediación de la conducta, como la elaboración de planes conductuales complejos, la toma de decisiones y la adecuación del comportamiento social a cada momento, y se considera

que estas funciones las realiza mediante la coordinación de pensamientos y acciones de acuerdo con metas internas (Miller et al., 2002; Szczepanski and Knight, 2014).

1.6.2 Mecanismo de acción de la cocaína

La cocaína es una sustancia psicoestimulante obtenida como extracto purificado de la planta de coca, la *Erythroxylum coca*, endógena en América del Sur, México e Indonesia. En América del Sur, la coca ha formado parte de las culturas inca, aimara y quechua durante miles de años. Actualmente, en las culturas andinas aún es común masticar hojas de coca y beber mate de coca, a pesar de las presiones gubernamentales para erradicar estas prácticas. Al masticarla, se experimenta una sensación de euforia, se elimina el apetito, la sed, el dolor y el cansancio, además de ayudar a superar el mal de altura. No fue hasta 1860 en que Albert Neiman aisló un extracto de coca, la cocaína, que su uso se extendió rápidamente por todo el mundo, llegando a formar parte incluso de la composición de productos como vino, enjuagues bucales o la Coca-Cola. En 1903, debido a la aparición de informes negativos respecto al consumo de cocaína, se prohibió su uso y las marcas que incluían cocaína en sus productos tuvieron que retirarla (Goldstein et al., 2009). Aunque hoy en día su posesión, cultivo y distribución son ilegales, su consumo se encuentra ampliamente extendido, suponiendo un elevado coste sanitario y social para toda la población, ya que se deriva un gran número de muertes de su consumo y de la violencia que gira en torno a su producción y distribución, además del coste económico invertido en la lucha policial y judicial contra los narcotraficantes.

Hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo para este trastorno adictivo, aunque recientemente se propuso un tratamiento basado en la vacunación de los enfermos, estimulando el sistema inmune para crear anticuerpos específicos contra la molécula de cocaína y evitando así que ésta llegue al cerebro (Kosten and Domingo, 2013). Los resultados obtenidos en ensayos clínicos han demostrado que los pacientes que presentan niveles altos de anticuerpos contra la cocaína reducen el consumo de esta sustancia, aunque sólo el 38% de los pacientes vacunados llega a presentar suficientes anticuerpos en plasma, y tan solo durante unos 2 meses, por lo que es necesaria la mejora de este tratamiento para poderlo implantar. Por otro lado, otros estudios apuestan por actuar sobre el catabolismo de la cocaína, de modo que la modificación de las enzimas responsables de la hidrólisis del éster de cocaína permitiría acelerar el metabolismo de la droga y reducir así sus efectos tóxicos en situaciones de sobredosis aguda de cocaína (Chen et al., 2017a).

Los primeros estudios acerca del mecanismo de acción de la cocaína revelaron que era capaz de inhibir la recaptación de monoaminas como la dopamina, la noradrenalina y la serotonina (Moore and Gudelsky, 1977; Ross and Renyi, 1967). Aunque la cocaína actúa de forma similar sobre estos transportadores, la mayoría de los efectos sobre el comportamiento y la actividad motora se atribuyen al bloqueo de la recaptación de dopamina y al consecuente aumento de concentración de este neurotransmisor en el espacio intersináptico (Giros et al., 1996; Miczek and Yoshimura, 1982). Más adelante, mediante técnicas de microdiálisis, se confirmó que las drogas de abuso comparten la propiedad de inducir un aumento del nivel de dopamina en el NAc (Di Chiara and Imperato, 1988). Actualmente, gracias al modelaje molecular del DAT, basado en la estructura cristalina de un transportador de leucina homólogo en bacterias (Beuming et al., 2008), ha sido propuesta la unión de la cocaína al DAT (Figura 38). Según este modelo, el sitio de unión de la cocaína en el DAT se superpone con el de la dopamina y las anfetaminas, incluyendo a las hélices TM 1, 3, 6 y 8, por lo que la dopamina no es capaz de unirse a DAT ni de ser recaptada por éste, comportando un aumento de dopamina en el espacio intersináptico e induciendo una sobreestimulación de las vías dopaminérgicas. Este hallazgo cierra la puerta a la posibilidad de generar un inhibidor competitivo de la unión de cocaína, ya

que también se estaría compitiendo con la recaptación de dopamina. Recientemente se ha comprobado que la unión de cocaína al DAT no impide únicamente la recaptación de dopamina, sino que actuaría además como un agonista inverso, promoviendo el transporte en la dirección contraria y contribuyendo aún más en el nivel de dopamina intersináptico (Heal et al., 2014; Jean et al., 2017).

El aumento de la concentración de dopamina es un mecanismo de acción común de la mayoría de drogas de abuso, sin embargo, muchos trabajos han puesto de manifiesto que el aumento de este neurotransmisor tras la exposición a cocaína no es exclusivamente debido al bloqueo de DAT. En condiciones fisiológicas, la actividad fásica de las neuronas dopaminérgicas de la VTA genera una señal de aprendizaje cuando tiene lugar una recompensa inesperada (Schultz et al., 1997). El propósito de esta señal es promover un aprendizaje que permita obtener de nuevo esta recompensa. Cuando esta recompensa pasa a ser completamente predecible, las neuronas dopaminérgicas no se activan más y cesa el aprendizaje. La potencia farmacológica de las drogas de abuso recae en su capacidad para anular este sistema, generando un aprendizaje inapropiado que, en última instancia, lleva al consumo compulsivo de la droga a expensas de todos los demás comportamientos (Lüscher, 2016). De modo que, en base a este modelo, la adicción a cocaína debe considerarse una enfermedad por aumento de función del sistema de recompensa dopaminérgico. Si esto es cierto, una estimulación directa y sostenida de las neuronas dopaminérgicas, sin la participación del transportador DAT, debería tener efectos similares a los observados en animales adictos. Esto ha sido confirmado en estudios realizados mediante técnicas optogenéticas con animales en los que el transportador DAT no está bloqueado, observándose que la autoestimulación de las neuronas dopaminérgicas de la VTA induce plasticidad sináptica en el NAc y resulta en un refuerzo positivo para los ratones, los cuales apretarán la palanca cientos de veces por hora para recibir la ráfaga estimuladora. Además, la inyección de cocaína acaba con la autoestimulación optogenética de las neuronas dopaminérgicas en estos ratones, evidenciando que estos dos mecanismos comparten circuitos neuronales subyacentes (Pascoli et al., 2015). Otros estudios también han cuestionado el mecanismo clásico de acción de la cocaína, ya que tanto ratones deficientes para dopamina (Hnasko et al., 2007), como ratones KO para DAT (Rocha, 2003), mantenían la autoadministración de cocaína o la preferencia de lugar condicionada (CPP) asociada a esta droga, observándose además el papel de otros sistemas como el serotoninérgico en la acción reforzadora de la cocaína.

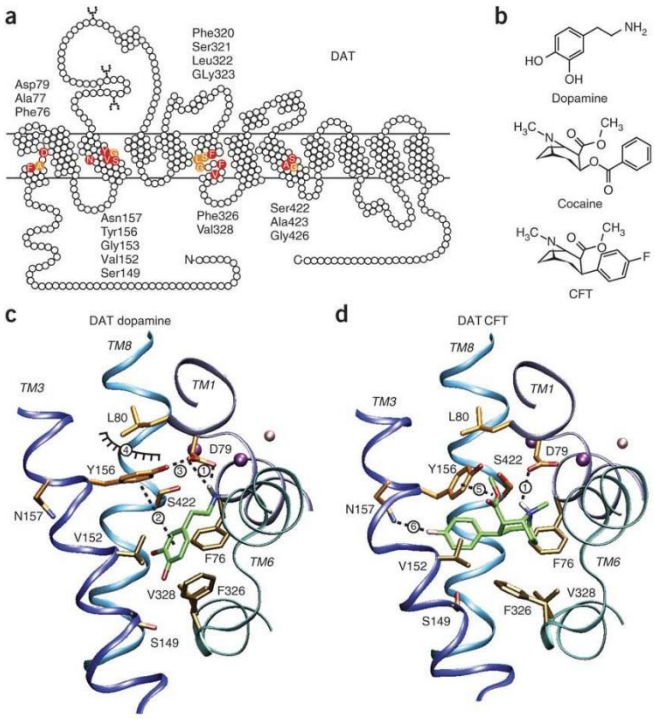


Figura 38. (a) Representación esquemática bidimensional del transportador de dopamina (DAT) humano. Los círculos de color indican residuos de interacción con dopamina o el análogo de la cocaína CFT, por la cadena lateral (rojo) o bien por la cadena principal (naranja). (b) Estructura química de la dopamina, la cocaína y el CFT. (c) Esquema de la interacción de DAT con la dopamina. (d) Esquema de la interacción de DAT con el CFT. (Extraído de Beuming et al., 2008).

A nivel de comportamiento, aún se desconocen en gran parte los mecanismos que conllevan los cambios asociados a su consumo, como el incremento de la excitabilidad e hiperactividad, normalmente asociado a un aumento en la agresividad e irritabilidad en primera instancia, convirtiéndose a largo plazo en conductas erráticas y compulsivas. Un hipotético mecanismo inductor de los cambios conductuales consecuentes a la administración crónica de cocaína es la alteración de la plasticidad sináptica del cerebro, que además dejan al adicto en una situación de vulnerabilidad a futuras recaídas (Wolf, 2016). En conformidad con esta hipótesis, han sido descritos cambios en la estructura de las dendritas tras el consumo de cocaína relacionados con los cambios de comportamiento, como alteraciones en proteínas del citoesqueleto o implicadas en las *gap junctions*, o cambios en los mecanismos que regulan la excitabilidad de las neuronas, concretamente en la composición de las subunidades de los NMDARs y AMPARs (Christian et al., 2017; Creed et al., 2016; Zhu et al., 2016). Además, existe una hipótesis prominente que considera de gran importancia el péptido CARTp (*Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript peptide*), ya que reduce la acción de la cocaína o dopamina, particularmente en el NAc, lo que constituye un importante mecanismo regulador de los efectos de estas moléculas (Kuhar, 2016). Concretamente se ha observado que la inyección de CARTp en el NAc es capaz de reducir el incremento de la actividad motora inducido por la cocaína (Jaworski et al., 2003), así como la autoadministración de la droga (Jaworski et al., 2008). Sin embargo, tras el tratamiento continuado de animales con cocaína y su consecuente adicción, el péptido CARTp deja de mostrar su efecto, hecho que se cree parte del mecanismo de addición (Job et al., 2013). Se cree que el mecanismo que subyace al efecto inhibidor de CARTp requiere de la liberación de dopamina extracelular y de la activación simultánea de D_1R y D_2R (Moffett et al., 2011), aunque la acción de CARTp se produciría inicialmente por su unión al receptor CART, un GPCR acoplado a proteína Gαi, aunque este receptor no ha sido clonado aún y es necesaria su caracterización para comprender los mecanismos de addición a cocaína a nivel molecular (Kuhar, 2016; Rogge et al., 2008).

Los primeros estudios sobre la acción de la cocaína eran realizados en base a modelos celulares neuronales, sin embargo, a medida que han pasado los años, distintos grupos han empezado a utilizar modelos celulares no neuronales, en los que no se expresa el transportador DAT, para desarrollar sus investigaciones. Sin embargo, en estos trabajos también han sido observados efectos inducidos por la exposición a esta droga, hecho que ha llevado a explorar la capacidad de la cocaína de interaccionar con otros elementos. Hoy en día es un hecho aceptado que la cocaína puede interaccionar con otras proteínas y un ejemplo de ello son los receptores sigma (Sharkey et al., 1988), por lo que se propuso a estos receptores como dianas terapéuticas para la lucha contra la adicción a la cocaína (Cobos et al., 2008; Mésangeau et al., 2008). Esta familia de proteínas está formada por σ_1R y σ_2R, ambos capaces de unir cocaína pero sin ligando endógeno conocido, por lo que se trata de proteínas moduladoras que ejercen sus efectos a través de la interacción con otras proteínas (Kim, 2017). Todos estos resultados sugieren que existe una gran variedad de mecanismos de acción a través de los cuales la cocaína provoca su amplio abanico de efectos.

1.6.3 Receptor sigma-1

Aunque inicialmente se creía que el σ_1R era un subtipo de receptor opioide, actualmente se ha definido claramente como una proteína chaperona asociada a membrana (Hayashi and Su, 2007), cuya estructura cristalina fue obtenida recientemente, mostrando una arquitectura trimérica con un único dominio transmembrana en cada protómero, además de una estructura hidrofóbica plana en el CTD que quedaría en contacto con la membrana lipídica (Figura 39) (Schmidt et al., 2016). El σ_1R se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo, incluidos los distintos tipos celulares del SNC. A nivel celular, se encuentra predominantemente en la

membrana del RE, que está físicamente asociada a la membrana mitocondrial externa, formando la llamada MAM (*mitochondria-associated ER membrane*), donde regula el intercambio de Ca^{2+} entre orgánulos mediante su interacción con el receptor de IP_3, aunque también se ha detectado en la membrana plasmática asociado a balsas lipídicas (*lipid rafts*) (Hayashi and Su, 2001, 2003, 2005b, 2007). Puede ser activado o inactivado por numerosos compuestos, incluida la cocaína, los opioides y ligandos del D_2R o del NMDAR, entre muchos otros. Tras su activación, puede translocarse a la membrana plasmática u otros compartimentos celulares y unirse a múltiples receptores y proteínas, a través de los cuales ejerce sus efectos moduladores. Como se ha comentado anteriormente y se detalla en el siguiente apartado, en nuestro grupo de investigación se demostró la capacidad de σ_1R de heteromerizar con el D_1R y su implicación en la acción de la cocaína (Navarro et al., 2010) (véase apartado 1.6.4 Implicación del receptor sigma-1 y el receptor D_1 en la adicción a cocaína). Años después se descubrió que también el D_2R forma heterómeros con σ_1R (Navarro et al., 2013; Pinton et al., 2015) y otros grupos han reportado la capacidad de σ_1R de interactuar con canales de K^+ como los SK y los Kv1.2 (Kourrich et al., 2013; Martina et al., 2007), así como con la subunidad GluN1 del NMDAR, que tras la activación de σ_1R acaba siendo fosforilada por PKC y PKA y aumentando su expresión, reforzando la inducción del dolor mediada por el NMDAR (Balasuriya et al., 2013; Kim et al., 2008). A nivel cerebral, la activación de σ_1R ha mostrado tener efectos sobre la plasticidad y la memoria mediante la modulación de canales iónicos dependientes de voltaje y la modulación de la actividad de factores de transcripción como NFκB, CREB y c-fos, los cuales a su vez regulan la expresión de genes pro- y antiinflamatorios, así como genes asociados a la muerte y supervivencia celular (Meunier and Hayashi, 2010; Ruscher and Wieloch, 2015). Además, en la membrana plasmática, puede controlar directamente la arborización dendrítica mediante el incremento de Rac-GTP, en parte mediante la regulación de los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Tsai et al., 2009).

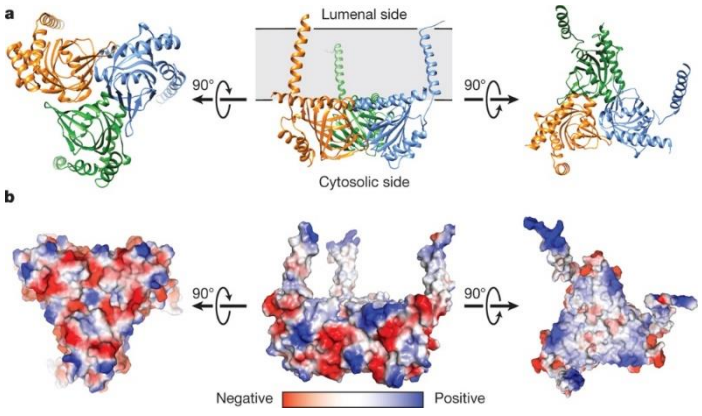


Figura 39. Estructura del receptor σ_1. (a) Desde una perspectiva perpendicular al plano de la membrana, el σ_1R muestra una estructura triangular compuesta por la asociación de tres protómeros, cada uno con un único dominio transmembrana situado en un vértice del triángulo oligomérico. (b) Los colores en la estructura reflejan el potencial electroestático de los residuos, revelando una superficie citosólica polar (imagen izquierda) y una superficie de interacción con la membrana no polar (imagen derecha), flanqueada por residuos con carga positiva, lo que sugiere que se encuentra parcialmente insertada en la membrana. (Extraído de Schmidt et al., 2016).

Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, el σ_1R constituye una clase única de proteínas capaz de influir y participar en un amplio rango de funciones biológicas, modulando la excitabilidad, la plasticidad y la viabilidad celular. En condiciones patológicas, como en procesos de adicción a cocaína, el σ_1R también se encuentra estrechamente relacionado en diferentes aspectos, como la hiperlocomoción (Menkel et al., 1991), la sensibilización (Menkel et al., 1991), el mecanismo de recompensa (Romieu et al., 2002, 2000), las convulsiones y la letalidad (Matsumoto et al., 2001a). Además, se ha demostrado que la disminución de la expresión del σ_1R cerebral mediante el uso de oligonucleótidos anti-sentido, así como el uso de antagonistas sintéticos de σ_1R, disminuye las acciones convulsivas y locomotoras estimulantes de la cocaína (Matsumoto et al., 2001b, 2002, 2003). Por lo tanto, estos hallazgos indican que las acciones de la cocaína, al menos en parte, pueden ser mediadas por su unión al σ_1R. El hecho de que el σ_1R no señalice por sí mismo,

dificulta la clasificación de ligandos de σ_1R como agonistas o antagonistas. Se ha establecido que la cocaína actúa como un agonista para este receptor de manera que, al activarlo, éste se disocia de la chaperona BIP presente en la interfaz RE-mitocondria, hecho que acaba provocando una entrada prolongada de Ca^{2+} a la mitocondria (Hayashi and Su, 2007). En células endoteliales microvasculares cerebrales, Brailoiu y colaboradores describieron que la cocaína inhibe la entrada de Ca^{2+} típicamente observada después de haberse causado una depleción intracelular de este ion, y lo hace de forma dependiente de σ_1R, mostrando su importancia generalizada en la homeostasis de este ion (Brailoiu et al., 2016). Una vez disociado de BIP, el σ_1R es translocado desde la MAM hacia el RE, la membrana plasmática, la mitocondrial o la nuclear, interactuando con múltiples proteínas y activando factores de transcripción. Así, la cocaína ejerce parte de sus efectos como consecuencia de la interacción que el σ_1R mantiene con otras proteínas, entre ellas receptores y transportadores de membrana. Concretamente, la cocaína es capaz de potenciar la señalización de D_1R por la vía de la proteína Gαs/AC, y de inhibir la señalización del D_1R y el D_2R por la vía de las MAPKs ERK1/2 al unirse a los heterómeros σ_1R-D_1R y σ_1R-D_2R, respectivamente, e independientemente de DAT (Navarro et al., 2010, 2013; Pinton et al., 2015) (véase apartado 1.6.4 Implicación del receptor sigma-1 y el receptor D_1 en la adicción a cocaína). Resultados recientes muestran como el tratamiento crónico con cocaína acaba reduciendo drásticamente la señalización por dopamina inducida por la esta droga, desplazando el equilibrio existente entre la señalización de D_1R y D_2R durante la intoxicación hacia una señalización predominantemente inducida por D_1R (estimuladora) con respecto al D_2R (inhibidora), hecho que facilitaría el consumo compulsivo (Park et al., 2013). En consonancia con estos resultados, Cahill y colaboradores mostraron la importancia de la interacción del D_1R con la subunidad GluN1 del NMDAR en las adaptaciones inducidas por la cocaína a largo plazo, ya que al aplicar un péptido que interfiere en esta interacción no se vieron afectadas las respuestas agudas a cocaína pero sí se redujo la sensibilización conductual (Cahill et al., 2014). Por otro lado, la cocaína es capaz de promover la formación de heterómeros, como el σ_1R-Kv1.2 y el σ_1R-SK, un fenómeno asociado con la redistribución de estas proteínas desde el RE hacia la membrana plasmática e implicado en las respuestas neuronales y conductuales al consumo de cocaína (Kourrich et al., 2013; Martina et al., 2007). Recientemente se ha demostrado también la interacción directa entre σ_1R y el DAT: se ha sugerido que la unión de cocaína al σ_1R promueve la disociación de multímeros de σ_1R a monómeros, que consecuentemente podrán interactuar con el DAT y estabilizarlo en una conformación que favorece su unión a cocaína, hecho que se ha propuesto como subyacente a la potenciación conductual de la autoadministración de cocaína en modelos animales (Hong et al., 2017).

Por último, las consecuencias funcionales observadas a nivel cerebral derivadas del consumo de cocaína y, en última instancia de la activación y translocación de σ_1R, son el aumento de la permeabilidad vascular y disfunción de la BBB, la activación de la microglía, así como astrogliosis y daño cerebral por neurotoxicidad (Cai et al., 2017; Yang et al., 2016; Yao et al., 2009a, 2011). Ya que el tratamiento con antagonistas de σ_1R ha mostrado gran capacidad de mitigar algunos efectos celulares y conductuales, como la hiperactividad y la neurotoxicidad, inducidos por el consumo de psicoestimulantes como la cocaína y la metanfetamina, el σ_1R representa una potencial diana terapéutica en trastornos de adicción a psicoestimulantes (Matsumoto et al., 2004; Yasui and Su, 2016). Por último, cabe destacar que, además de su implicación en los trastornos de adicción, se han relacionado alteraciones del σ_1R con otros desórdenes, como la depresión, el dolor neuropático, enfermedades cardiovasculares e incluso se ha descrito una mutación de σ_1R como una de las causas del desarrollo y progresión de la esclerosis lateral amiotrófica juvenil en humanos (Al-Saif et al., 2011; Castany et al., 2018; Hashimoto, 2013).

1.6.4 Implicación del receptor sigma-1 y el receptor D_1 en la adicción a cocaína

Dada la importancia del sistema dopaminérgico en el proceso de adicción y, concretamente, la mayor implicación del D_1R tanto en la promoción de las respuestas impulsivas como compulsivas a la cocaína, este receptor ha sido un importante objeto de estudio de esta Tesis y en este apartado se profundiza acerca de cuál es su implicación, junto con el σ_1R, en el trastorno de adicción a cocaína.

Aunque son necesarios más estudios para explorar el papel de los D_1Rs en adicción a psicoestimulantes, se han obtenido resultados importantes, como su previamente comentada implicación en la acción inhibidora de los efectos de la cocaína mediada por el péptido CARTp (Kuhar, 2016; Moffett et al., 2011). Numerosos estudios de comportamiento han mostrado que el bloqueo selectivo de D_1R inhibe la autoadministración de la droga, la reinstauración de la autoadministración después de ser aplicados agonistas dopaminérgicos y la CPP (Beninger and Miller, 1998; Bossert et al., 2007; Brennan et al., 2009; Carati and Schenk, 2011). Además, la autoadministración de cocaína es inexistente en ratones KO para el D_1R, hecho que confirma que el D_1R juega un papel esencial en el desarrollo de la adicción a cocaína (Caine et al., 2007). En consonancia con esta evidencia, estudios recientes de neuroimagen mediante PET (tomografía por emisión de positrones) han revelado que, en individuos adictos a cocaína, una baja ocupación de D_1Rs estaba asociada a una mayor tendencia a preferir la autoadministración de cocaína frente a una recompensa monetaria (Martinez et al., 2009). Del mismo modo, individuos con una disponibilidad menor de D_1Rs en el estriado mostraron una mayor propensión a correr riesgos en su conducta, una característica de la personalidad que se ha asociado a un mayor riesgo de caer en la adicción (Takahashi et al., 2010).

Como se ha comentado en el apartado anterior, en el 2010 fue descrita la heteromerización entre D_1R y σ_1R, mecanismo por el cual los σ_1Rs son capaces de modular la actividad del receptor D_1R, así como las consecuencias del consumo de cocaína sobre esta interacción (Navarro et al., 2010). Según se demostró en este trabajo mediante ensayos de BRET con BiFC, se trata de una interacción proteína-proteína que implica un mínimo de un homodímero de D_1Rs y un σ_1R, en consonancia con la naturaleza oligomérica de los D_1Rs (Kong et al., 2006). También se observó que la unión de la cocaína a los σ_1Rs causa una modificación en la estructura cuaternaria del heterómero que implica la separación de los extremos del CTD de los D_1Rs en el heterotrímero σ_1R-D_1R-D_1R, la cual es detectada por una marcada reducción en la señal de BRET. Por otro lado, mediante técnicas de inmunocitoquímica (ICC), se analizó la distribución subcelular de ambos receptores y se observó que la coexpresión de los D_1Rs y σ_1Rs produce una alteración de la distribución subcelular del σ_1R, ya que en presencia del D_1R el σ_1R se expresa más en la membrana plasmática que en membranas intracelulares. De acuerdo con que la presencia de ligandos de los σ_1Rs, incluyendo la cocaína, puede causar la translocación de los σ_1Rs a la membrana plasmática (Hayashi and Su, 2005a), en este trabajo se observó que además de un incremento en la expresión de los σ_1Rs en la membrana, la cocaína incrementa la colocalización de D_1R y σ_1R. Por tanto, según estos resultados la heteromerización entre estos receptores se produce en ausencia de ligandos, pero la unión de cocaína puede inducir un incremento de la cantidad de heterómeros en la membrana plasmática.

A nivel funcional y en consonancia con los cambios estructurales detectados por BRET, se reveló que, en células transfectadas en las que no se expresa DAT, la unión de la cocaína a σ_1R incrementa de forma muy significativa la acumulación de cAMP mediada por agonistas del D_1R. Cabe señalar que este efecto sinérgico sobre el D_1R podría constituir, al menos en parte, la base molecular mediante la cual la cocaína potencia la señal inducida por el D_1R sobre la inducida por el D_2R. Al analizar la vía de las MAPKs, se descubrió que la cocaína incrementa la fosforilación de ERK1/2 por sí misma, aunque este efecto es dependiente de la presencia de ambos

receptores, σ_1R y D_1R. Esto se comprobó también en cortes de estriado de ratón, pero no se observó en ratones deficientes para σ_1R, corroborando que estos fenómenos son mediados específicamente por σ_1R. Además, se reportó que la fosforilación de ERK1/2 inducida tanto por la cocaína como por la activación del D_1R se bloquea por los antagonistas de ambos receptores, lo que constituye un fenómeno de *cross*-antagonismo, así como por el agonista del otro receptor en el complejo, mostrando un *cross-talk* negativo (Navarro et al., 2010). En base a estos resultados, un efecto a corto plazo de la cocaína, mediante su unión al σ_1R, puede consistir en focalizar la señalización de los D_1Rs hacia la vía del cAMP y, consecuentemente, inducir un incremento en la actividad de las neuronas que proyectan del NAc a la VTA, que se encuentran estrictamente limitadas a las neuronas que expresan el D_1R (Anderson and Pierce, 2005).

En conclusión, la aplicación de ensayos interdisciplinarios que combinen técnicas de bioquímica y visualización molecular con neurociencia cognitiva y psiquiatría clínica podría aportar en un futuro nuevas perspectivas para la comprensión de la neurobiología de los trastornos de adicción, así como para el desarrollo de terapias innovadoras.

1.7 Enfermedad de Huntington

1.7.1 Etiología y síntomas

La enfermedad de Huntington (HD) es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la aparición de corea progresiva, deterioro cognitivo y perturbaciones emocionales (Figura 40) (Roos, 2010). George Huntington describió por primera vez la sintomatología clínica de la forma adulta de la enfermedad, además de poner de manifiesto su patrón de herencia (Huntington, 1872). Más adelante, fue descrita la forma juvenil de la enfermedad, con un inicio previo a los 21 años y la posibilidad de cursar con síntomas muy diferentes a los del desorden de inicio adulto (Westphal, 1883). El redescubrimiento de los trabajos de Mendel a principios del siglo XX permitió reconocer que la enfermedad seguía claramente un patrón de herencia autosómico dominante que, según la OMS, afecta igual a hombres y mujeres en todo el mundo, con una incidencia de entre 5 y 7 casos por cada 100.000, calculada en países occidentales. La forma adulta se manifiesta típicamente entre los 30 y los 45 años, siguiendo su curso durante unos 15 o 20 años, mientras que en la forma juvenil los pacientes raramente alcanzan la edad adulta.

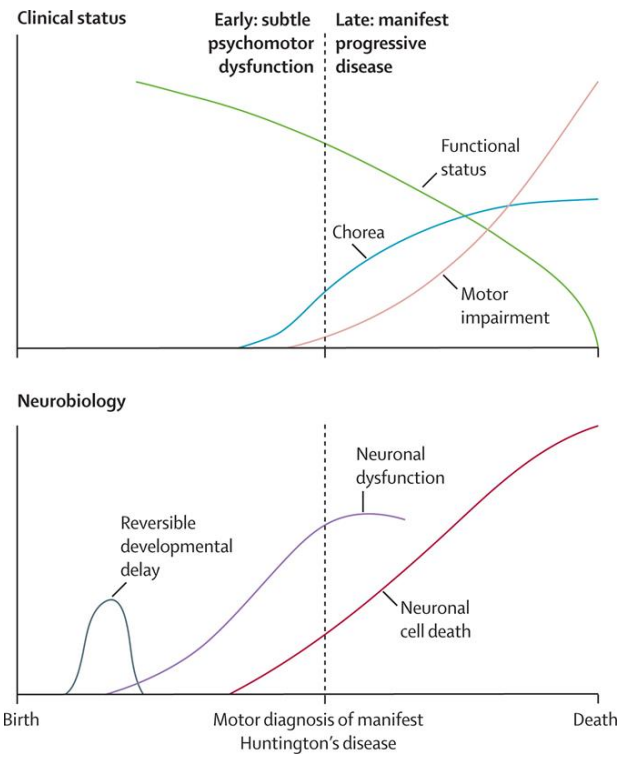


Figura 40. Progresión de la enfermedad de Huntington a lo largo de la vida del paciente. Aparecen signos y síntomas sutiles años antes del diagnóstico motor, que correlacionan con cambios neurobiológicos como la atrofia estriatal. La corea suele ser el primer síntoma motor, asociado con la disfunción neuronal de etapas iniciales, mientras que la muerte neuronal que se produce en etapas avanzadas correlaciona con los síntomas motores más severos y la discapacidad funcional. (Extraído de Ross and Tabrizi, 2011)

La enfermedad está causada por una expansión inestable de tripletes CAG en el exón 1 del gen *HTT*. Este gen fue clonado el año 1993 por el Grupo de colaboración para la enfermedad de Huntington, compuesto por seis laboratorios distintos. Se localiza en el cromosoma 4p16.3 en humanos y codifica para la proteína huntingtina, que presenta un alto grado de conservación entre especies (The Huntington's disease collavorative Research group, 1993). La huntingtina es una proteína multifuncional, de la que aún se desconocen muchas de sus funciones, que se expresa de manera ubicua tanto en humanos como en roedores, con altos niveles en las neuronas del SNC y, en particular, en las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza que proyectan hacia el estriado (Fusco et al., 1999; Marques Sousa and Humbert, 2013; Trottier et al., 1995). El número de repeticiones del triplete CAG del gen de la huntingtina, que implica la traducción de un fragmento elongado de glutaminas, es polimórfico en la población no afectada por la enfermedad, en el rango de 6 a 35 unidades. Cuando el gen presenta una expansión de más de 40 unidades, la penetrancia es completa, mientras que en el rango de 36-39 repeticiones la penetrancia es incompleta, existiendo casos que nunca llegan a ser diagnosticados clínicamente. Aunque la mutación en el gen *HTT* es la responsable del desarrollo de la enfermedad, hoy en día se conocen diversos genes y polimorfismos genéticos que pueden influenciar el inicio y patogénesis de la enfermedad a través de varios mecanismos, como excitotoxicidad, alteraciones metabólicas y transcripcionales, proteínas desplegadas y estrés oxidativo (Gusella et al., 2014; Vuillaume et al., 1998). Así, esta variabilidad genética explica porqué, aun estando el número de repeticiones CAG relacionado directamente con la gravedad de los síntomas e inversamente con la edad de aparición de los primeros síntomas motores, la realidad muestra grandes diferencias entre pacientes con número similar de repeticiones.

La consecuencia final de la mutación en el gen HTT es la neurodegeneración masiva en el cerebro, con una pérdida predominante, aunque no única, de neuronas de proyección en los núcleos caudado y putamen, responsable de los síntomas clásicos de la enfermedad (Reiner et al., 1988; Thompson et al., 1988). Actualmente, no se considera simplemente un desorden de los ganglios basales, ya que existe una degeneración cerebral global que además exhibe marcadores detectables incluso antes de que se manifiesten los síntomas motores, hecho que no resulta sorprendente teniendo en cuenta la ubicuidad y multifuncionalidad de la proteína huntingtina (Dayalu and Albin, 2015). En estadios iniciales de la enfermedad se presentan alteraciones cognitivas y psiquiátricas progresivas, así como alteraciones emocionales, que acaban provocando en la mayoría de casos una pérdida de peso, alteraciones en el comportamiento sexual y en el ciclo sueño-vigilia, relacionadas parcialmente con la disfunción hipotalámica (Politis et al., 2008). En estadios avanzados la enfermedad se caracteriza por invalidantes síntomas motores, como la corea, la distonía, la bradiquinesia y la rigidez, además de la aparición de demencia progresiva y el empeoramiento gradual global de procesos mentales complejos que implican comprensión, razonamiento, juicio y memoria (Rosenblatt, 2007). Para establecer la severidad de la neurodegeneración, Jean Paul Vonsattel estableció un sistema de grados basado en el patrón de degeneración estriatal en tejidos *post mortem*. Así, aunque el grado 0 es indistinguible de los cerebros normales tras la exploración general, mediante exploración histológica se puede cuantificar entre un 30 y un 40% de pérdida neuronal en el núcleo caudado; en el grado 1 se observa atrofia, pérdida neuronal y astrogliosis en este mismo núcleo; los grados 2 y 3 se caracterizan por una atrofia general y progresiva del estriado, mientras en el grado 4, el de más severidad, se observa atrofia y pérdida neuronal de hasta un 95% (Vonsattel et al., 1985). El análisis *post mortem* de cerebros de pacientes con HD sugiere un patrón de degeneración diferencial entre subpoblaciones de neuronas de proyección estriatales, de manera que en estadios iniciales de la enfermedad se produce una pérdida de neuronas de la vía indirecta que expresan D_2R y que proyectan desde el estriado al GPe y probablemente también de las que proyectan a la SNr, mientras que las neuronas de la vía directa que expresan D_1R y proyectan al GPi degeneran en estadios mucho más avanzados (Albin Roger L. et al., 2004; Deng et al., 2004;

Han et al., 2010; Reiner et al., 1988). Como se ha comentado anteriormente, el estriado no es la única región afectada y múltiples estudios neuropatológicos muestran que en los pacientes con grado 3 y 4 también se ven profundamente afectadas la corteza cerebral, el globo pálido, el tálamo, la SN, núcleos subtalámicos, el hipotálamo y el cerebelo (Kassubek et al., 2004; Niccolini and Politis, 2014).

Los tratamientos actuales no pueden impedir ni retrasar la aparición de la enfermedad, así que se limitan a una farmacoterapia sintomática para las alteraciones conductuales y la corea, además de otros cuidados de soporte y paliación. Unos de los fármacos prescritos más comunes para el control de los movimientos involuntarios son la tetrabenazina, un selectivo y potente inhibidor del transportador vesicular de monoaminas 2 que acaba causando depleción de monoaminas sinápticas, y la olanzapina, un neuroléptico atípico que bloquea el D_2R, aunque únicamente muestran eficacia en etapas iniciales de la enfermedad. Los mayores retos de las investigaciones actuales consisten en identificar una terapia capaz de modificar la enfermedad, como el silenciamiento del gen HTT mutado. La mejora en la comprensión de la patogénesis genética y molecular muy probablemente conllevará la aparición de nuevos fármacos candidatos con mayores probabilidades de éxito (Dickey and La Spada, 2017).

1.7.2 Neurodegeneración en la enfermedad de Huntington

A nivel celular, la proteína huntingtina *wild type*, es decir no causante de HD, ha sido detectada predominantemente en el citoplasma y también asociada con diferentes orgánulos, incluido el RE, el aparato de Golgi, las mitocondrias y el núcleo (Kegel et al., 2002, 2005; Ray, 2011; Strehlow et al., 2007). A nivel neuronal, se ha detectado su expresión en neuritas y sinapsis, asociada a estructuras vesiculares (Bulgari et al., 2017). Sus funciones biológicas normales aún están siendo definidas, aunque algunas ya han sido elucidadas, como su papel crítico en el desarrollo del SNC, ya que la inactivación total de la huntingtina en ratones KO causa la muerte del embrión el día 8,5 (Duyao et al., 1995). También ha sido descrita su implicación en la inhibición de la apoptosis, siendo capaz de bloquear la formación del apoptosoma y por consiguiente también la activación de caspasas 3 y 9, además de interaccionar directamente con la caspasa-3 e inhibir su actividad proteolítica y de participar en la vía PI3K-Akt, favoreciendo la expresión de genes pro-supervivencia y suprimiendo la de genes pro-apoptóticos (Saudou and Humbert, 2016; Schulte and Littleton, 2011; Zhang et al., 2006). Concretamente, la huntingtina favorece la transcripción del gen pro-supervivencia BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), así como el transporte axonal y liberación de vesículas que contienen este factor, que resulta de gran importancia para el mantenimiento de una correcta función corticoestriatal, ya que tras su liberación en estas sinapsis, receptores Trkβ son activados, endocitados y transportados retrógradamente al soma de la neurona estriatal, donde activan señalización pro-supervivencia. En este proceso, la huntingtina también regula directamente la endocitosis y transporte retrógrado de vesículas con BDNF-Trkβ. Por lo tanto, la huntingtina asegura tanto la correcta liberación anterógrada de BDNF en la sinapsis corticoestriatal, como su transporte retrógrado hacia el soma, donde también regula la transcripción génica (Saudou and Humbert, 2016; Zuccato and Cattaneo, 2014). Por otro lado, también se ha descrito la implicación de la huntingtina en procesos de autofagia selectiva y en adhesión celular (Lo Sardo et al., 2012; Ochaba et al., 2014). Sin embargo, las funciones bioquímicas específicas de la huntingtina en estos procesos tampoco se conocen con profundidad. Se ha formulado la hipótesis que, una pérdida o modulación de la función normal de esta proteína, además de la reportada ganancia de función que se comentará a continuación, podría tener un importante papel en la patogénesis de la HD (Bates et al., 2015; Zuccato and Cattaneo, 2014).

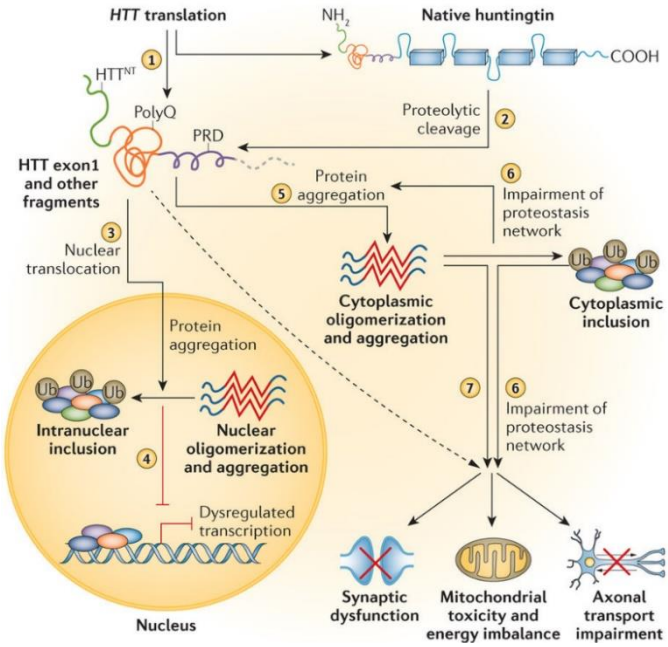


Figura 41. Representación de los principales mecanismos de patogénesis celular en la enfermedad de Huntington. (Extraído de Bates et al., 2015)

La HD está causada principalmente por la toxicidad subyacente a una ganancia de función de la proteína huntingtina mutada (mhtt), aunque, como se ha comentado anteriormente, la pérdida de función también contribuiría en gran medida al empeoramiento sintomático en esta enfermedad (Cisbani and Cicchetti, 2012). Se ha reportado que la mhtt sufre una alteración en su propia transcripción debido a la expansión del segmento de glutaminas, que tras un *splicing* aberrante se produce una molécula de mRNA truncada que tan solo codifica para el exón 1, el cual contiene el dominio de poliglutaminas (Sathasivam et al., 2013). Incluso cuando la secuencia completa de la proteína mutante es transcrita y traducida, proteasas celulares pueden provocar la formación de fragmentos N-terminales cortos que contienen la expansión de poliglutaminas (Landles et al., 2010). Independientemente de cómo se han formado, estos fragmentos N-terminales de mhtt resultarían tóxicos como monómeros y como oligómeros, mientras que se cree que agregaciones de orden superior podrían ser compensatorias más que patogénicas (Arrasate and Finkbeiner, 2012; Dayalu and Albin, 2015; Hoffner and Djian, 2015). Es necesario un mayor estudio acerca de la contribución a la toxicidad de los fragmentos de mhtt con distinto grado de oligomerización. Recientemente se ha publicado un método para detectar y diferenciar estos fragmentos, tanto en células como en tejido animal, que permitirá asociar el grado de toxicidad con los distintos fragmentos y correlacionarlo con el avance de la enfermedad (Ochaba et al., 2018). Múltiples estudios con modelos animales y con muestras humanas de pacientes con HD han permitido identificar diversos mecanismos clave mediante los cuales los fragmentos de mhtt resultarían tóxicos (Figura 41). En primer lugar, se ha descrito la capacidad de la mhtt de perturbar la transcripción de diversos genes (Landles and Bates, 2004; Steffan et al., 2000), entre los que cabe destacar a ciertos receptores de neurotransmisores, como los $mGlu_{1-3}$, los D_1R y D_2R, así como canales iónicos y el factor BDNF que, como se ha indicado anteriormente, resulta neuroprotector y necesario para el mantenimiento de una adecuada sinapsis corticoestriatal (Cha et al., 1999; Hodges et al., 2006; Pérez-Navarro et al., 2000; Zuccato et al., 2001). Además de una disminución en el nivel de BDNF, también se ha reportado una disminución en su receptor Trkβ y un incremento en la expresión de otro receptor de BDNF, el receptor de neurotrofina p75 (p75NTR), que induciría la activación de cascadas apoptóticas (Brito et al., 2013, 2014). Con su presencia en el núcleo, además de afectar a la transcripción génica también se han detectado agregados proteicos de nucleoporinas, resultando en una perturbación del complejo del poro nuclear y por tanto un defectivo transporte nucleocitoplasmático (Grima et al., 2017). También se ha indicado la capacidad de la mhtt de alterar el citoesqueleto, la endocitosis mediada por clatrina y el transporte axonal de vesículas como consecuencia de su interacción aberrante con proteínas citoplasmáticas asociadas a los microtúbulos y a la maquinaria endocítica (Caviston and Holzbaur, 2009). Por otro lado, la mhtt podría causar una saturación del sistema de degradación de proteínas celulares por afectación del proteosoma y lisosomas, impidiendo la degradación de proteínas agregadas o mal plegadas (Bennett et al., 2007; Wang et al., 2008). Además, la mhtt parece alterar la dinámica mitocondrial

mediante la reducción de la transcripción del factor PGC1α, que a su vez regula la transcripción de muchos genes importantes para la correcta estructura y función mitocondrial (Cui et al., 2006; Johri et al., 2013). Como consecuencia, las neuronas más afectadas por la mhtt presentan niveles reducidos de ATP, evidencias de estrés oxidativo y fisión mitocondrial (Browne et al., 1997; Cherubini and Ginés, 2017; Liot et al., 2017; Mochel et al., 2012; Reddy and Shirendeb, 2012; Shirendeb et al., 2011), aunque estos eventos se han detectado también en astrocitos, por lo que se ven afectadas las sinapsis, observándose una mayor vulnerabilidad en las sinapsis tripartitas estriatales (Oliveira, 2010). Por último, también ha sido estudiada en profundidad la excitotoxicidad y perturbación de la homeostasis del Ca^{2+} como mecanismo patogénico clave de la mhtt, producido mediante la sensibilización directa por parte de la mhtt de los NMDARs, concretamente a través de la subunidad GluN2B (Chen et al., 1999; Zeron et al., 2001, 2002), mediante la interacción de la mhtt con el receptor de IP_3 tipo 1 (Tang et al., 2005), así como por un déficit de transcripción del transportador de glutamato tipo 1 (GLT-1) en astrocitos, contribuyendo así a la excitotoxicidad por un aumento de glutamato en el espacio intersináptico (Estrada-Sánchez and Rebec, 2012; Rebec, 2018). Estos cambios resultan en una señalización excesiva por Ca^{2+} en la neurona, que puede acabar activando vías apoptóticas, lo que respalda numerosos estudios que han sugerido la estimulación de NMDARs como causa principal de la neurodegeneración en HD, particularmente en el estriado (Fan and Raymond, 2007; Heng et al., 2009; Raymond, 2017; Zeron et al., 2002) (véase apartado 1.7.4 Implicación de D_1R, H_3R y NMDAR en la enfermedad de Huntington).

Dada la robusta evidencia experimental para todos estos mecanismos, es muy posible que los efectos tóxicos pleiotrópicos de la mhtt sean los responsables de la neurodegeneración, aunque ciertos mecanismos pueden resultar más importantes que otros en ciertos tipos neuronales. Muchos de los mecanismos descritos anteriormente son comunes en otras enfermedades neurodegenerativas, como la PD y la AD, aunque en el caso de HD se conoce el punto de partida, que es la mutación de un único gen. Así, el estudio de la patogénesis en HD podría ayudar no únicamente a los pacientes que la padecen sino también a aquellos que presenten otros tipos de neurodegeneración (Dayalu and Albin, 2015).

1.7.3 Poblaciones neuronales afectadas en la enfermedad de Huntington

El proceso de neurodegeneración se inicia típicamente en el núcleo caudado y el putamen, con gliosis reactiva y distrofia en las neuritas de las neuronas. El avance de la enfermedad hace que los signos de la patología progresen hacia el caudado rostral y el putamen ventral en primera instancia, y que en pacientes con patología avanzada se observe una expansión de los ventrículos laterales y una dramática degeneración de neuronas en las regiones adyacentes al estriado y en la corteza cerebral, incluyendo regiones frontales, parietales y temporales (Bates et al., 2015; Dayalu and Albin, 2015; Raymond et al., 2011).

A nivel celular, la HD se presenta con una vulnerabilidad diferencial de subpoblaciones neuronales, tanto en el estriado como en la corteza. El estriado es una estructura con una organización anatómica heterogénea, ya que presenta núcleos funcionales diferenciados en una región dorsal, compuesta por el núcleo caudado y el putamen, y una región ventral o NAc, además de presentar subpoblaciones neuronales bien diferenciadas (véase apartado 1.3.3 Circuitos dopaminérgicos y su relevancia fisiológica en el SNC y Figura 22). El desequilibrio en la actividad de las vías directa e indirecta permite explicar las alteraciones motoras asociadas con el daño en los ganglios basales como los movimientos coreiformes y la posterior bradiquinesia en la HD. Las MSNs de la vía indirecta son el tipo celular que primeramente se ve afectado en el inicio de la HD, asociado a la hipercinesia, junto con una degeneración de neuronas corticales glutamatérgicas que proyectan al estriado y que se asocia a las deficiencias cognitivas y

alteraciones psicológicas (Figura 42) (Albin et al., 2004; Deng et al., 2004; Han et al., 2010; Reiner et al., 1988). Esta degeneración diferencial inicial de las MSNs se debe muy probablemente a la inervación diferencial que reciben de la corteza, siendo las MSNs de la vía indirecta las que reciben una mayor liberación de glutamato en las terminales corticoestriatales (Reiner et al., 2003), hecho que las haría más susceptibles en la HD dado que la mayor entrada de glutamato proviene de la corteza. A su vez, las neuronas piramidales corticales que inervan a las MSNs de la vía indirecta reciben una mayor excitación debido a sus grandes árboles dendríticos, comparado con las neuronas piramidales que inervan a las MSNs de la vía directa (Morishima and Kawaguchi, 2006). Además, se sumaría el hecho de que las MSNs de la vía indirecta son más excitables que las de la vía directa por presentar un umbral menor para el potencial de acción y una superficie dendrítica menor (Cepeda et al., 2008; Gertler et al., 2008). A medida que progresa la enfermedad, se observa la pérdida de las MSNs de la vía directa, por lo que la falta de estimulación del GPi acaba provocando una severa acinesia, así como la pérdida de interneuronas parvalbuminérgicas, hecho que contribuye a la distonía y rigidez que caracterizan los estadios más avanzados (Reiner and Deng, 2018). A parte del estriado, también se observa pérdida de neuronas corticales de las capas III, V y VI, así como neuronas del tálamo, hipotálamo, GP y otros núcleos subcorticales, llevando a una atrofia generalizada de la substancia gris en estadios avanzados de la enfermedad (Kassubek et al., 2004; Niccolini and Politis, 2014; Raymond, 2017; Reiner and Deng, 2018).

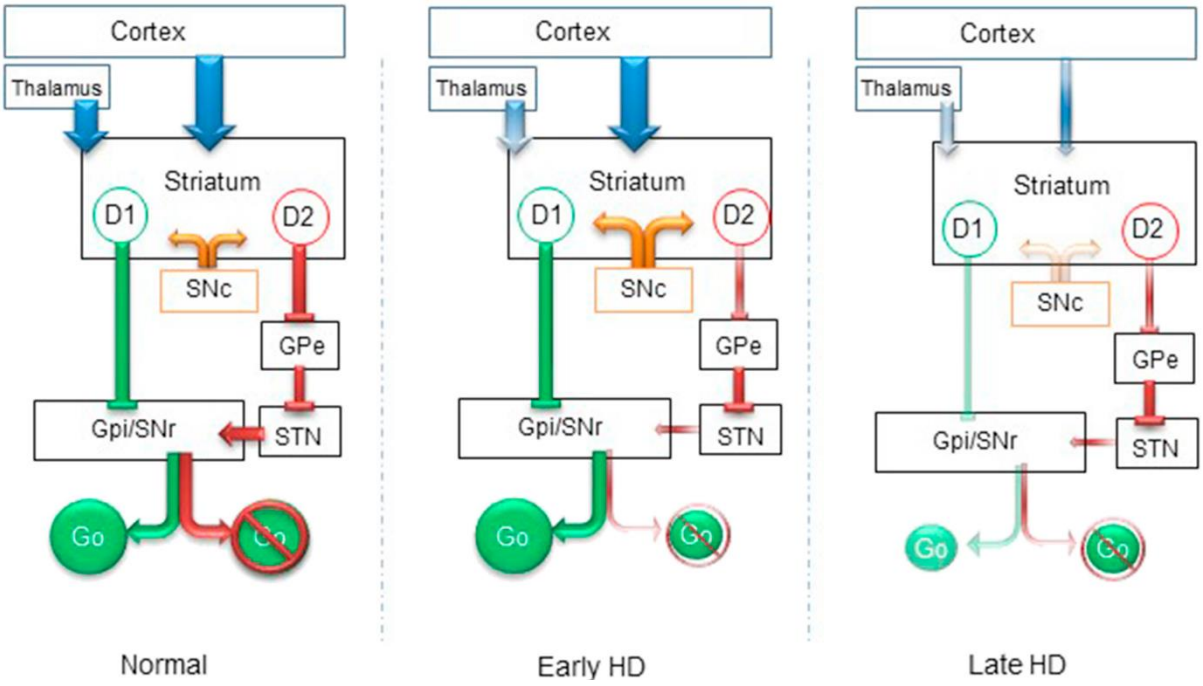


Figura 42. Representación esquemática de las principales conexiones en los ganglios basales y los cambios producidos en estadios iniciales y tardíos de la enfermedad de Huntington. (Extraído de Raymond, 2017)

Las células gliales juegan un papel importante en la patogénesis de la HD y, concretamente en el caso de los astrocitos, se ha reportado una asociación entre la presencia de astrocitos reactivos y la severidad de la disfunción y muerte neuronal (Clabough, 2013; Escartin and Bonvento, 2008; Seifert et al., 2006). La reactividad astrocitaria va asociada generalmente a una reactividad microglial y, en algunos casos, a un reclutamiento leucocitario. La microglía, que constituyen las células del sistema inmunitario residentes en el cerebro, podrían incluso ser responsables de una subsecuente activación astrocitaria y podrían coordinar procesos complejos de neuroinflamación (Popovich and Longbrake, 2008). De hecho, recientemente se ha detectado que los astrocitos reactivos liberan el factor lipocalina-2 (lcn2) en respuesta a la neurodegeneración, un factor que a

su vez promueve la muerte celular y la activación de más astrocitos y microglía (Bi et al., 2013). Por otro lado, como se ha comentado en el apartado anterior, como consecuencia de la expresión de mhtt por parte de los astrocitos, estos muestran una reducción en la expresión del transportador de glutamato tipo 1 y por tanto una disminución en la recaptación de glutamato extracelular, contribuyendo así a la elevación del nivel de este neurotransmisor en el espacio intersináptico y, probablemente, a la excitotoxicidad (Estrada-Sánchez and Rebec, 2012; Rebec, 2018; Shin et al., 2005). Además, en condiciones no patológicas, los astrocitos son capaces de producir BDNF y de responder a éste (Dougherty et al., 2000), por lo que se propuso como estrategia terapéutica la inducción de la sobreexpresión de BDNF en estos tipos celulares mediante terapia génica, resultando en una notable neuroprotección y una mejora en pruebas conductuales dependientes del núcleo estriado (Giralt et al., 2010). Por último, los astrocitos también son responsables de suplir a las neuronas con colesterol, una molécula clave para la correcta sinaptogénesis y liberación de neurotransmisores (Mauch et al., 2001; Thiele et al., 2000). En astrocitos de modelos de HD de ratón, se ha detectado una disminución en la biosíntesis del colestreol, aunque aún no se ha determinado si esta alteración en la homeostasis del colesterol está implicada en la patogénesis de HD o bien ocurre como un evento secundario (Valenza and Cattaneo, 2011).

1.7.4 Implicación de D_1R, H_3R y NMDAR en la enfermedad de Huntington

Múltiples estudios se han centrado en el análisis de posibles cambios en la densidad de receptores en modelos animales y pacientes con distintos grados de HD, así como de las implicaciones funcionales que se derivan de estos cambios. Dado que el principal objeto de estudio de esta Tesis recae en el receptor dopaminérgico D_1 y el histaminérgico H_3, así como en su interacción con otros receptores como el glutamatérgico NMDA, en este apartado se detalla la implicación de estos tres receptores en la patogénesis de la HD.

El estudio de las sinapsis glutamatérgicas corticoestriatales en condiciones no patológicas, que se encuentran moduladas por la dopamina y sus receptores (André et al., 2010a; Cepeda and Levine, 2006), mediante el uso de animales que expresan EGFP junto con D_1R o D_2R, permitió corroborar que las respuestas inducidas por glutamato en las MSNs están moduladas por el subtipo de receptor de dopamina mayormente expresado en la neurona. Así, el tratamiento con agonistas de D_1R resulta en un incremento de las corrientes inducidas por NMDAR y AMPAR en las MSNs de la vía directa, mientras que se observa una disminución de estas corrientes en la vía indirecta al tratar con agonistas de D_2R (André et al., 2010a, 2010b; Cepeda et al., 1993). Concretamente, esta modulación por parte del D_1R se produce incrementando la función de NMDARs y AMPARs mediante múltiples vías de señalización, entre ellas la formación de cAMP, la fosforilación de subunidades específicas del NMDAR y la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Blank et al., 1997; Liu et al., 2004; Price et al., 1999). Gracias también al uso de estos animales que expresan D_1R o D_2R con EGFP, se descubrió que distintas subunidades del NMDAR juegan un papel diferencial en la modulación por parte de D_1R, siendo las subunidades GluN2A las que contribuyen más a las respuestas mediadas por NMDAR en las MSNs que expresan D_1R, mientras que las subunidades GluN2B contribuyen en mayor medida a las respuestas del NMDAR originadas en las MSNs que expresan D_2R (Jocoy et al., 2011), hecho que tiene importantes implicaciones no sólo en la plasticidad sináptica sino también en la vulnerabilidad neuronal selectiva observada en la HD. De hecho, se ha observado que la expresión de mhtt potencia las corrientes y la excitotoxicidad mediadas por NMDARs que contienen GluN2B como subunidad predominante y se ha sugerido que la interacción de la mhtt con la GluN2B contribuiría selectivamente a la disfunción y degeneración neuronales (Chen et

al., 1999; Zeron et al., 2001, 2002), lo que explicaría, al menos en parte, porqué las MSNs de la vía indirecta son las primeras en degenerar.

Durante las fases tempranas de la HD, antes de que ocurra la degeneración neuronal, los niveles de dopamina están incrementados y la expresión de receptores D_1R y D_2R reducida, mientras que, en fases avanzadas en las que se produce pérdida neuronal, tanto los niveles de dopamina como de sus receptores se ven significativamente reducidos. Estos cambios temporales en la transmisión dopaminérgica se producen en paralelo a cambios bifásicos en la transmisión sináptica glutamatérgica y son probablemente los responsables de las alteraciones observadas en la actividad sináptica mediada por receptores de glutamato (Chen et al., 2013; Glass et al., 2000). Aunque la visión tradicional sostiene que las primeras MSNs en verse afectadas en la HD son las de la vía indirecta, por ser las primeras en degenerar, existen evidencias recientes que sugieren que la vía directa estaría afectada previamente por la activación de D_1Rs (Bunner and Rebec, 2016; Galvan et al., 2012). Además, en etapas tempranas de la HD, los niveles de receptores de glutamato están incrementados y la neurotransmisión glutamatérgica está específicamente incrementada en las MSNs de la vía directa que expresan D_1R. Así, la sobreactivación específica de las MSNs de la vía directa conllevará la inhibición excesiva de las neuronas del GPi y la SNr y consecuentemente la desinhibición del tálamo y la aparición de movimientos involuntarios. El consecuente incremento en la liberación de glutamato sobre las MSNs conllevará la disfunción y degeneración preferencial de las MSNs de la vía indirecta que, como se ha comentado en el apartado anterior, son más vulnerables a la sobreactivación de NMDARs. Esta disfunción y degeneración de las MSNs de la vía indirecta, comportará la desinhibición del GPe, la inhibición del núcleo subtalámico y el GPi y, consecuentemente, también la inducción de movimientos anormales. Aunque una de las dos poblaciones de MSNs se vea alterada antes que la otra, es más que probable que la sobreactivación de D_1Rs en las MSNs de la vía directa en conjunción con la disminución funcional de la vía indirecta desencadenen la descoordinación en los movimientos que provocan corea y bradiquinesia en HD, ya que estudios recientes indican que los movimientos coordinados son fruto de la regulación de ambas vías actuando de forma complementaria (Rangel-Barajas and Rebec, 2016; Tecuapetla et al., 2016).

La hipótesis de la excitotoxicidad en HD clásicamente sugería que la neurodegeneración estriatal es causada por un exceso de glutamato o bien por una sobreactivación de sus receptores, especialmente de NMDARs extrasinápticos (Carvajal et al., 2016; Milnerwood et al., 2010, 2012; Okamoto et al., 2009; Parsons and Raymond, 2014). En pacientes sintomáticos con HD, se observa una reducción en la recaptación de glutamato en la corteza prefrontal que no es debida a una neurodegeneración, por lo que se sugirió que esta alteración podría contribuir a la disfunción neuronal y neurodegeneración posteriores (Hassel et al., 2008). Los niveles de glutamato en las terminales corticoestriatales y talamoestriatales están regulados, además de por su recaptación, por heterorreceptores que modulan presinápticamente su liberación como el D_2R, el CB_1R, el H_3R, mGluRs o el $GABA_B$, y se ven además alterados por la presencia de mhtt en las terminales axonales, la cual impide tanto la recaptación como la liberación de glutamato por la alteración del sistema de vesículas (André et al., 2010a; Li et al., 2003; Molina-Hernández et al., 2001; Schlicker and Kathmann, 2001). Como consecuencia de la hipodopaminergia y de la disminución de los niveles de endocannabinoides que se dan en etapas avanzadas de HD, la falta de inhibición por parte de los D_2Rs y CB_1Rs presinápticos podría contribuir a la desregulación glutamatérgica. En cuanto a la expresión de los receptores de glutamato, se observa una disminución de los niveles de NMDAR y AMPAR primero en el estriado y posteriormente en la corteza (Cha et al., 1999, 1998; Fan and Raymond, 2007). Un estudio reciente ha reportado que la mhtt, además de estabilizar a la subunidad GluN2B en NMDARs extrasinápticos, redirecciona NMDARs que contienen la subunidad GluN3A hacia la superficie celular en neuronas estriatales, contribuyendo a la pérdida de sinapsis, mientras que la deleción genética de esta subunidad es capaz de prevenir

la degeneración sináptica, el declive motor y cognitivo y la pérdida neuronal (Marco et al., 2013). Por otro lado, en los últimos años se han aportado evidencias de que elevadas dosis de dopamina también son capaces de inducir muerte celular, tanto por la toxicidad producida por la oxidación de la propia molécula como por la sobreactivación de D_1Rs (Jakel and Maragos, 2000; McLaughlin et al., 1998; Wersinger et al., 2004). Dado que en etapas iniciales de la enfermedad los niveles de dopamina están incrementados, se ha sugerido que podrían contribuir también a la excitotoxicidad y disfunción neuronal. Además, en un modelo celular de HD (Trettel et al., 2000), se observó que los NMDARs aumentan específicamente la vulnerabilidad de células con mhtt a la toxicidad por dopamina, ya que el pretratamiento con NMDA muestra un incremento en la muerte celular inducida por la activación de D_1R en estas células pero no en las *wild type* (Paoletti et al., 2008). Así, la alteración de las interacciones entre los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico explicarían por qué el estriado y la corteza, regiones que reciben múltiples inervaciones de dopamina y glutamato, son las regiones más vulnerables en la HD. Debido a que son regiones interconectadas, resulta difícil determinar si los cambios corticales preceden o siguen a los estriatales. Aun así, el hecho de que pacientes con HD experimenten alteraciones cognitivas y emocionales antes del inicio de los síntomas motores sugiere que la disfunción cortical precedería a la estriatal. Además, según se ha comentado anteriormente, la activación tanto de D_1Rs como de D_2Rs llevaría finalmente a una disfunción cortical y estriatal que, sumada a las alteraciones celulares patogénicas de la propia mhtt, comportarían la subsecuente y progresiva disfunción y degeneración neuronales, ampliándose además a otras regiones cerebrales (André et al., 2010a).

En cuanto a los síntomas cognitivos en la HD, subyacentes a la disfunción cortical en etapas iniciales, se ha observado que la señalización a través de D_1R en la corteza prefrontal, donde estos receptores superan ampliamente en número a los D_2Rs, juega un papel importante junto con los NMDARs en la modulación de la actividad neuronal asociada a la memoria de trabajo (Castner and Williams, 2007). Para una correcta función cognitiva, es necesario que los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico señalicen en apropiada conjunción, hecho que se consigue por la interacción directa entre NMDARs y D_1Rs y la correcta liberación de neurotransmisores. En situaciones patológicas como la HD en que esta señalización se ve alterada, la desincronización acaba provocando un déficit en la plasticidad sináptica inducida por los NMDARs, base molecular de los procesos cognitivos complejos. Un estudio comprobó que activando D_1Rs era posible rescatar la LTP en la corteza prefrontal de animales modelo de HD (Dallérac et al., 2011). Por otro lado, otro estudio afirma que una sobreactivación de D_1Rs contribuye a los déficits cognitivos en HD (Tyebji et al., 2015). Estos resultados evidencian la necesidad de una adecuada estimulación dopaminérgica para una correcta función cognitiva, que no se cumple en el caso de la HD, ya que se presentan episodios iniciales de hiperdopaminergia seguidos de un progresivo déficit de este neurotransmisor y de la expresión de D_1R, constituyendo probablemente una de las causas principales de la disfunción cognitiva en esta enfermedad.

El sistema histaminérgico también se ve afectado en la HD, siendo el TMN el núcleo que contiene la mayor densidad de inclusiones citoplasmáticas y nucleares de mhtt, además de verse aumentados los niveles de histamina de forma generalizada, mientras que los niveles de expresión de los distintos subtipos de receptores varía en función de la región analizada (Shan et al., 2015; van Wamelen et al., 2011). Por lo que respecta al H_3R, sus niveles se ven disminuidos en múltiples regiones de cerebros de pacientes con HD analizados *postmortem*, especialmente en el estriado, aunque algunas regiones como el giro frontal inferior muestran un incremento de su expresión (Goodchild et al., 1999). Existe una correlación positiva entre el nivel de mRNA del H_3R en el giro frontal inferior y el número de repeticiones CAG en el gen HTT, hecho que aporta evidencias de una conexión causal entre los cambios observados en la señalización histaminérgica y la HD (van Wamelen et al., 2011). El H_3R, actuando como heterorreceptor

presináptico capaz de regular la liberación de histamina y otros neurotransmisores como el glutamato y la dopamina (Molina-Hernández et al., 2001), es capaz de contribuir a la disminución de estos neurotransmisores en el espacio sináptico, pudiendo ejercer así una función neuroprotectora en un contexto de excitotoxicidad. En estadios iniciales de HD en los que hay una disfunción neuronal sin excitotoxicidad, un exceso de histamina podría tener un efecto negativo sobre la función cognitiva en la corteza prefrontal, así como contribuir al desequilibrio del ciclo sueño-vigilia, causando insomnio en la mayoría de los pacientes (Shan et al., 2012; van Wamelen et al., 2011). Por otro lado, el H_3R tiene una importante función postsináptica en los ganglios basales, donde su expresión es especialmente elevada, aunque se ve drásticamente disminuida en etapas avanzadas de la HD. Como se ha comentado anteriormente (véase apartado 1.4.5 Interacciones del receptor H_3 con otros GPCRs: heterómeros D_1R-H_3R), la interacción del H_3R con el D_1R y el D_2R en la membrana postsináptica de las MSNs permite la regulación de la transmisión dopaminérgica por la vía de las MAPKs, regulando así la plasticidad sináptica, supervivencia celular y actividad locomotora (Ferrada et al., 2008; Moreno et al., 2011a; Rapanelli et al., 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004). Además, recientemente también ha sido demostrada la interacción del H_3R con el $A_{2A}R$ en estriado de rata, concretamente en las terminales presinápticas corticoestriatales glutamatérgicas y en las intraestriatales GABAérgicas (Márquez-Gómez et al., 2017). En las primeras, la activación únicamente de $A_{2A}R$ o de H_3R supone un aumento o una disminución de la liberación de glutamato respectivamente, mientras que una coactivación en estas terminales facilita aún más la liberación de glutamato, resultando en una hiperestimulación de las MSN de la vía directa que podría contribuir a la desregulación en HD. El estudio de la implicación del $A_{2A}R$ en la HD ha dado lugar a múltiples evidencias del beneficio de actuar farmacológicamente sobre este receptor (Blum et al., 2013; Cha et al., 1999; Lee and Chern, 2014; Li et al., 2015), aunque futuros experimentos deberían contemplar su capacidad de heteromerizar con otros receptores, como el H_3R, el D_2R y el CB_1R (Carriba et al., 2007; Hillion et al., 2002; Márquez-Gómez et al., 2017; Moreno et al., 2018; Navarro et al., 2008), así como la implicación de estos y otros heterómeros en la regulación de la transmisión glutamatérgica y dopaminérgica.

Ciertamente, los avances en el desarrollo terapéutico en la HD se han beneficiado de la existencia de modelos de ratón altamente representativos de la enfermedad y de la disponibilidad de células madre pluripotentes procedentes de pacientes humanos, en las que es posible la diferenciación a subtipos neuronales específicos que permitan la validación de tratamientos potencialmente eficaces para la HD. Aunque la estrategia terapéutica más potente actualmente consiste en intentar modificar la enfermedad para reducir la carga patogénica promovida por la acumulación de mhtt, de manera que se retrase o incluso se evite el inicio de la enfermedad, probablemente la combinación de diversas terapias será la estrategia prevalente en un futuro para afrontar la sintomatología de esta enfermedad (Dickey and La Spada, 2017).

1.8 Enfermedad de Alzheimer

1.8.1 Etiología y síntomas

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo complejo que constituye la causa más frecuente de demencia y se caracteriza por un declive progresivo de la memoria, el lenguaje y otras funciones cognitivas, acompañado de un concurrente deterioro conductual, emocional, interpersonal y social (Kumar et al., 2015). Los daños que se producen en el sistema límbico y la corteza cerebral perjudican a la memoria y causan las alteraciones en el estado de ánimo, mientras que los daños producidos a nivel del tronco encefálico en las etapas avanzadas de la enfermedad alteran la función de los órganos, incluyendo el corazón y los pulmones. Se

estima que afecta aproximadamente a 24 millones de personas en todo el mundo y que probablemente se cuadruplicará para el año 2050 (Reitz and Mayeux, 2014). El mayor reto en relación con la AD consiste en conocer y entender su etiología y patogénesis, y es que, desde su primera descripción por Alois Alzheimer en 1907, esta enfermedad ha estado sujeta a muchísimos estudios sin haberse alcanzado una comprensión completa de la misma. Ya en la década de 1960, con el desarrollo de la microscopía electrónica, se identificaron por primera vez las placas neuríticas o placas seniles, así como los ovillos neurofibrilares, ambas consideradas estructuras comunes en la AD, aunque posteriormente se descubrió que también se forman durante la progresión de otras patologías (Ramirez-Bermudez, 2012). Las placas neuríticas se caracterizan por el depósito extracelular de péptido β-amiloide (Aβ), que se produce tanto en el parénquima cerebral como en los vasos sanguíneos cerebrales, donde son conocidas por formar la angiopatía cerebral amiloide. Los ovillos neurofibrilares están compuestos principalmente por filamentos helicoidales con proteína *tau* hiperfosforilada y su acúmulo acaba provocando la pérdida sináptica y neuronal (Kumar et al., 2015). Más adelante, se reportaron las primeras evidencias neuroquímicas acerca del papel de diversos neurotransmisores, especialmente de la Ach, cuyo déficit está asociado al declive cognitivo en esta enfermedad. El glutamato también juega un papel clave en esta enfermedad, por ser el principal implicado en los procesos de plasticidad sináptica y excitotoxicidad (Hunt and Castillo, 2012; Lau and Tymianski, 2010; Lewerenz and Maher, 2015). Recientemente, otros neurotransmisores como el GABA también se han propuesto como candidatos a ser regulados para tratar la sintomatología de la AD (Calvo-Flores Guzmán et al., 2018). Hasta el momento, se han postulado múltiples hipótesis para explicar la etiología de este desorden multifactorial, desde defectos genéticos, sobre todo en la forma familiar de la enfermedad, hasta alteraciones en el metabolismo o en la función mitocondrial, deficiencias en el metabolismo lipídico, déficit colinérgico, metabolismo de Aβ, excitotoxicidad, depósitos de proteína *tau*, neuroinflamación, estrés oxidativo e incluso la infección por lentivirus. La hipótesis prevalente durante las últimas dos décadas ha sido la de la formación de depósitos de Aβ, aunque actualmente se cree que no sería el único mecanismo que destruye e impide las funciones cerebrales en la AD y que incluso podría tratarse, junto con la formación de ovillos neurofibrilares, de una consecuencia más que la causa de la neurodegeneración en la AD (Figura 43) (Armstrong, 2014; Morelli et al., 2012; Reitz, 2012).

Para el diagnóstico de AD se siguen las claves propuestas por la *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS–ADRDA) (McKhann et al., 1984). Este criterio combina patrones clínicos y neuropatológicos y asigna el diagnóstico como AD "posible", "probable" o definitiva". Actualmente se considera que el espectro de la AD es más amplio de lo que se pensó en un inicio, por lo que el criterio NINCDS–ADRDA se encuentra bajo constante revisión. Una de las modificaciones ha consistido en la catalogación de un estado intermediario de la cognición, el MCI (*Mild Cognitive Impairment*), que no llega a ser considerado demencia pero que representa un gran riesgo de desarrollar AD para las personas que lo padecen. En los últimos años, se han incorporado nuevos marcadores para establecer el nivel de riesgo de padecer la AD, como el análisis

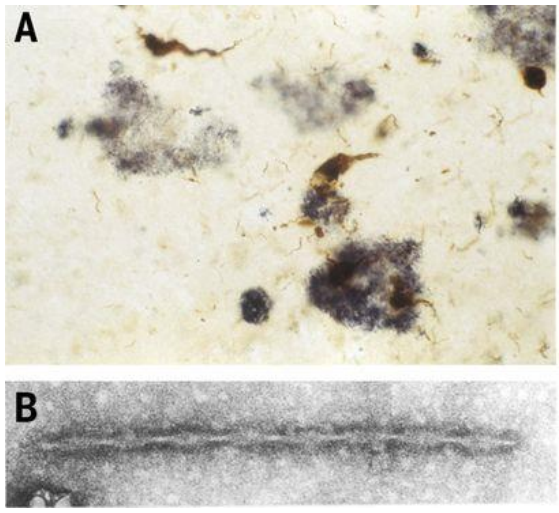


Figura 43. (A) Imagen de microscopía óptica de placas de Aβ (azul) y lesiones neurofibrilares de tau (marrón) en la corteza cerebral en la enfermedad de Alzheimer. (Extraído de Goedert, 2015). (B) Micrografía electrónica de la asociación de un par de filamentos helicoidales de tau, con un espacio entre sí de ~80 nm. (Extraído de Crowther et al., 1989).

estructural y funcional por resonancia magnética o la detección de Aβ mediante PET o mediante el análisis de líquido cefalorraquídeo (Reitz and Mayeux, 2014). Muy recientemente, ha sido publicado un método de detección de Aβ en sangre de gran fiabilidad que representa un menor coste económico y resulta mucho menos invasivo que las pruebas mencionadas anteriormente (Nakamura et al., 2018). Se conocen muchos factores de riesgo y protectores asociados a la AD, tanto genéticos como no genéticos. En cuanto a los factores no hereditarios de riesgo se encuentran el daño cerebrovascular, la hipertensión, la diabetes tipo 2, el déficit o exceso de peso corporal, el síndrome metabólico y el daño cerebral traumático, mientras que entre los factores protectores se ha reportado una dieta rica en antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados, así como la actividad física e intelectual regular. La mayoría de los factores genéticos identificados más recientemente están implicados en la producción y eliminación de Aβ, hecho que evidencia la importancia de esta vía en la patogénesis de la AD (Karch and Goate, 2015; Reitz and Mayeux, 2014; Rosenthal and Kamboh, 2014). Los genes que han mostrado una mayor asociación con la AD son el APOE4, PSEN1 y PSEN2, que codifican para la apolipoproteína E, la presenilina 1 y la presenilina 2, respectivamente. La apolipoproteína E es una proteína que transporta lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol hacia los tejidos, incluido el cerebro. Las presenilinas 1 y 2 forman la subunidad catalítica de la enzima γ-secretasa (Figura 44) y ciertas mutaciones en este gen son la causa de algunos de los casos de AD familiar y de inicio precoz (antes de los 65 años). Además de los genes APOE4, PSEN1 y PSEN2, se han detectado otros genes asociados a un alto riesgo de padecer AD, como TREM2 y CD33, dos genes que codifican para receptores del sistema inmune, evidenciando que la neuroinflamación podría tener un papel causal en la patogénesis de esta enfermedad. (Heneka et al., 2015). Gracias al análisis de los datos generados por los estudios de secuenciación del genoma y exoma humano, muchos más genes serán incorporados a la lista en un futuro próximo (Karch and Goate, 2015).

1.8.2 Neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer

La proteína precursora amiloide (APP) es normalmente fragmentada de forma secuencial por las enzimas α-, β- y γ-secretasas, de manera que queda liberado el dominio intracelular de la APP (AICD), un péptido modulador de la expresión génica, la apoptosis y las dinámicas del citoesqueleto (Figura 44) (Müller et al., 2008; Nalivaeva and Turner, 2013). De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, en la AD la APP es procesada de forma aberrante por las enzimas β y γ-secretasas, lo que resulta en un desequilibrio entre la producción y la eliminación del Aβ. Como consecuencia, Aβs se agregan espontáneamente para formar oligómeros solubles y también se fusionan formando fibrillas insolubles con conformación de láminas β que eventualmente se depositan en placas seniles difusas (Hardy John, 2009). Estudios recientes han demostrado que los oligómeros de Aβ42, capaces de inducir daño oxidativo, promover la hiperfosforilación de *tau* y causar efectos tóxicos en las sinapsis y mitocondrias, se producen por la acción cooperativa de neuronas y astrocitos (Dal Prà et al., 2015).

Aunque las placas seniles con Aβ42 aparecen en estadios avanzados de la enfermedad y no serían la principal causa del desarrollo de AD, no puede ser ignorada su capacidad de atraer y activar a la microglía, hecho que resulta en la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1β, TNF-α e IFN-γ (McGeer and McGeer, 2010; Rosenmann, 2013). A su vez, estas citoquinas estimulan astrocitos circundantes que producen aún más cantidad de oligómeros de Aβ42, favoreciendo su agregación y dispersión. Los oligodendrocitos, que forman parte de los complejos neurona-astrocito, también sufren daño y destrucción como consecuencia del estrechamiento y la degeneración vascular asociada a la agregación de oligómeros de Aβ42 (Suo et al., 2000), ya que los oligodendrocitos son particularmente vulnerables al estrés oxidativo generado en estas condiciones por contener bajos niveles de glutatión (Roth et al., 2005).

Además, los oligómeros de Aβ42 presentan una mayor capacidad de dañar membranas ricas en colesterol, que es precisamente la condición de los oligodendrocitos y de las células musculares lisas vasculares (Subasinghe Supundi et al., 2003). Tanto la hipoperfusión como el incremento de estrés oxidativo vascular son dos fenómenos comunes en la AD (Edwards and Rickard, 2007; Markesbery and Carney, 1999; Nakamura et al., 2007), así como la expresión aberrante de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y los bajos niveles de antioxidantes detectados ya en etapas iniciales de la enfermedad (Lüth et al., 2002; Malinski, 2007), lo que resulta en un incremento de la cantidad de productos derivados de la oxidación y nitrosilación en la sangre y el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con AD (Virarkar et al., 2013). La enzima nNOS tiene importantes funciones en la formación de memoria, el flujo de sangre en el SNC, la plasticidad neuronal y la transmisión de señales de dolor. En la AD se estimula la producción de NO como consecuencia de la activación de nNOS por parte de NMDARs extrasinápticos en condiciones de excitotoxicidad, contribuyendo a la inducción de muerte celular (Panthi et al., 2018).

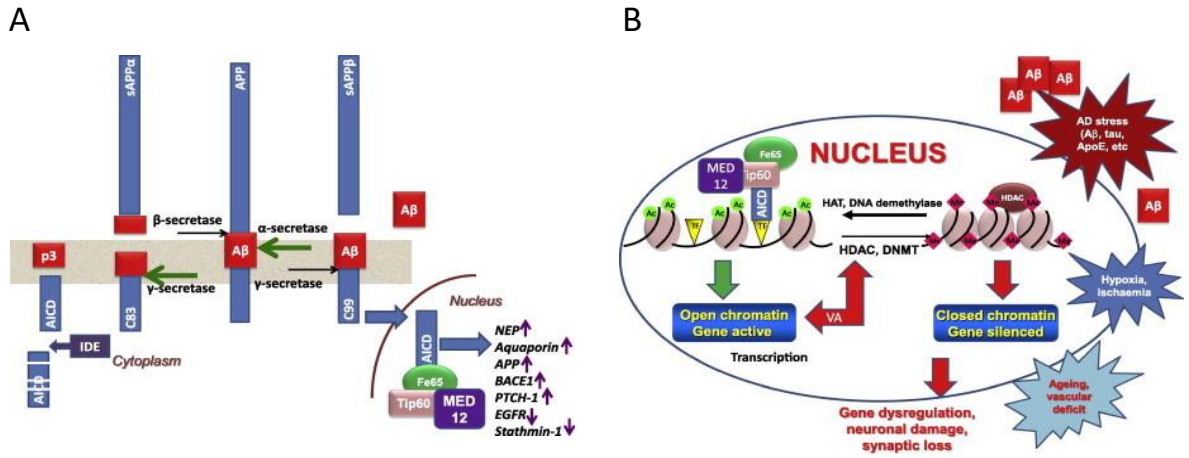


Figura 44. (A) Procesamiento proteolítico de la APP y generación de un AICD funcional. Se indican algunos de los genes regulados por el AICD. (B) Papel de los factores ambientales y estresantes en la remodelación de la cromatina y la regulación epigenética de los genes asociados a APP que pueden conllevar la pérdida sináptica y neuronal bajo condiciones como la isquemia, la hipoxia o el envejecimiento. (Extraído de Nalivaeva and Turner, 2013)

La eliminación de oligómeros de Aβ del cerebro se lleva a cabo mediante múltiples mecanismos como la degradación proteolítica, la captación por parte de astrocitos y microglía, el transporte pasivo hacia el líquido cefalorraquídeo y el secuestro en compartimentos vasculares (Baranello et al., 2015; Tarasoff-Conway et al., 2015; Wyss-Coray et al., 2003). En el caso concreto de los astrocitos, cabe destacar la expresión de proteasas capaces de degradar Aβ, como la neprilisina y la enzima degradadora de insulina, cuya expresión se ve disminuida con la edad, sugiriendo un posible mecanismo por el cual los depósitos de Aβ incrementan con el envejecimiento (Apelt et al., 2003; Wyss-Coray et al., 2003). Así, cualquier alteración en los mecanismos de degradación de oligómeros de Aβ también contribuye al desarrollo de la patogénesis de la AD, por lo que actuar adecuadamente sobre estos sistemas de regulación podría representar una eficaz diana terapéutica preventiva. De hecho, un efecto adverso del tratamiento con MK-801 o ketamina, ambos antagonistas no competitivos del NMDAR, consiste en la disminución de la expresión de neprilisina pero no de la enzima degradadora de insulina, resultando en una disminución de la degradación de Aβ (Yamamoto et al., 2013b). Cuando la producción de oligómeros de Aβ42 excede el límite de seguridad, estos se desprenden de las neuronas y entran en contacto con los receptores de astrocitos circundantes y de la propia neurona, además de acumularse y dispersarse por el exterior celular (Dal Prà et al., 2015). Se ha descrito que se produciría una difusión de oligómeros Aβ42 y de oligómeros de proteína tau hiperfosforilada vía exocitosis entre neuronas o con los astrocitos u oligodendrocitos asociados, que a su vez se convierten en productores de más oligómeros de Aβ42 y tau, propagándose de manera progresiva por la mayoría de regiones cerebrales (Braak and Tredici, 2011; Dal Prà et al., 2015; Eisele et al., 2010; Goedert, 2015).

En el exterior celular, Aβ42 interactúa con múltiples proteínas y receptores celulares. Se ha reportado que, mientras los monómeros de Aβ42 activan cascadas de señalización celulares neuroprotectoras interactuando con el receptor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1R), los oligómeros de Aβ42 son capaces de unirse y activar a múltiples receptores neuronales y astrocíticos, entre ellos el EphB2R, el p75NTR, el NMDAR, el α7-nAchR, receptores ApoE, el receptor sensor de CA^{2+} e incluso la proteína priónica celular (Armato et al., 2013; Dechant and Barde, 2002; Xu et al., 2012). Concretamente en el hipocampo, cuando los oligómeros de Aβ42 se unen a los astrocitos inducen tanto la liberación de glutamato desde estas células por su acción sobre los α7-nAchRs como la disminución de su recaptación debido a una menor expresión de GLT-1, prolongando así la acción del neurotransmisor y permitiendo que alcance NMDARs extrasinápticos (Figura 45). La acción de los oligómeros de Aβ42 sobre las neuronas provoca un aumento en la liberación de glutamato a nivel presináptico y una sobreactivación de NMDARs y AMPARs postsinápticos que acaba provocando la desensibilización e internalización de estos receptores y, consecuentemente, una depresión sináptica. La activación de NMDARs extrasinápticos, en cambio, provoca la producción de NO y ROS, la fosforilación de tau y la activación de la caspasa-3, todos ellos procesos implicados en la depresión sináptica y la pérdida de espinas dendríticas, que terminarán por debilitar e impedir las comunicaciones neuronales, además de activar vías de muerte celular, produciéndose finalmente una progresiva pérdida de memoria y una gran dificultad para generar nuevas conexiones (Kumar et al., 2015; Lewerenz and Maher, 2015; Rudy et al., 2015; Talantova et al., 2013). Por otro lado, algunos estudios sugieren que los oligómeros Aβ en realidad no actuarían directamente sobre el NMDAR, sino sobre el EphB2R, un receptor tirosina quinasa que en condiciones no patológicas se une al NMDAR y regula la formación de las sinapsis (Dalva et al., 2000; Nolt et al., 2011), provocando la degradación de EphB2R y como consecuencia una pérdida de función de los NMDARs y una reducida LTP, que puede ser rescatada por la sobreexpresión de EphB2R en el hipocampo (Cissé et al., 2011; Hu et al., 2017). En conjunto, estas evidencias sugieren que las interacciones interneuronales y con los astrocitos participantes en la sinapsis tienen un gran impacto en la progresión de la enfermedad, por lo que también los astrocitos podrían ser una diana terapéutica para la AD.

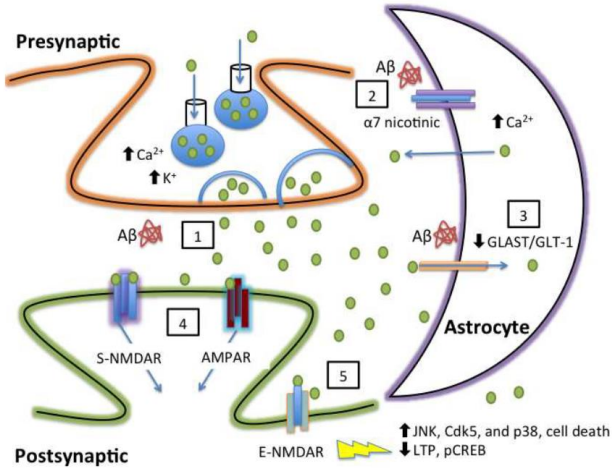


Figura 45. Mecanismos de aumento del glutamato extracelular mediados por oligómeros de Aβ y la resultante excitotoxicidad. (Extraído de Rudy et al., 2015).

Al igual que los oligómeros de Aβ, los oligómeros solubles de tau también se han visto implicados en la excitotoxicidad por glutamato (Hoover et al., 2010; Kopeikina et al., 2012) y pueden causar disfunción sináptica independientemente de Aβ (Crimins et al., 2013). En experimentos con ratones KO para tau se demostró *in vivo* que la proteína tau media o permite los efectos excitotóxicos de Aβ (Roberson et al., 2007). Desde este hallazgo, se ha identificado al complejo proteico GluN2B-PSD95-Fyn como punto de convergencia de tau, glutamato y Aβ (Roberson et al., 2011). Fyn es una tirosina quinasa que fosforila la subunidad GluN2B del NMDAR, estabilizando su interacción con PSD-95 (Nakazawa et al., 2001), hecho que incrementa la excitotoxicidad glutamatérgica inducida por Aβ. La proteína tau controla este proceso mediante su unión a Fyn y el subsecuente transporte a las espinas dendríticas. Así, la reducción de tau es capaz de prevenir los déficits de memoria y la excitotoxicidad causada por Aβ, un efecto atribuido a la reducción postsináptica de la proteína Fyn. Por otro lado, la

fosforilación de tau también aumenta la transmisión por parte de los NMDARs y la facilitación de LTD (Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Un estudio reciente aporta evidencias que corroboran este mecanismo patogénico y sugiere que la muerte neuronal inducida por Aβ, así como la fosforilación de tau vía GSK3β, es mediada por NMDARs que contienen subunidades GluN2B pero no GluN2A (Tackenberg et al., 2013). Sin embargo, tau no es necesario para todos los efectos de Aβ, ya que la pérdida de espinas dendríticas inducida por Aβ se da por una vía que implica a NMDARs que contienen la subunidad GluN2A e independientemente de tau (Tackenberg et al., 2013).

En base a los múltiples mecanismos patogénicos descritos, se ha propuesto y diseñado una gran variedad de tratamientos para intentar frenar o mejorar algunos de los síntomas de la AD. Actualmente, los únicos tratamientos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) incluyen 5 fármacos para tratar las manifestaciones cognitivas de la AD y consisten en los inhibidores de la acetilcolinesterasa rivastigmina (Exelon®), galantamina (Razadyne® y Reminyl®), tacrina (Cognex®) y donepezil (Aricept®), así com el antagonista del NMDAR memantine (Namenda®). Todos estos fármacos han demostrado su capacidad de frenar ligeramente la progresión de los síntomas cognitivos y de reducir los problemas conductuales en algunos pacientes, pero por lo menos la mitad de los enfermos por AD tratados con estos fármacos no responden a ellos (Anand et al., 2014). Por esta razón, al igual que en el caso de la HD, las estrategias actuales se centran en intentar modificar la enfermedad, de manera que se bloquee su progreso. Las estrategias más esperanzadoras incluyen inhibidores de γ- y β-secretasa, inmunoterapias que tienen como diana a la proteína tau y a Aβ, terapias con células madre, quelantes de Cu^{2+} y Zn^{2+}, fármacos que reducen el colesterol y antiinflamatorios no esteroideos (Epperly et al., 2017; Franco and Cedazo-Minguez, 2014; Galimberti et al., 2013; Li et al., 2014; Medina, 2018; Rosenmann, 2013; Sun, 2017).

1.8.3 Implicación de D_1R, H_3R y NMDAR en la enfermedad de Alzheimer

Por lo que respecta a los receptores de dopamina, como ha sido comentado anteriormente, tanto el D_1R como el D_2R resultan cruciales para los procesos de aprendizaje y memoria, especialmente a nivel de la corteza prefrontal y el hipocampo (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Yamasaki and Takeuchi, 2017). En condiciones no patológicas, la densidad de los D_1Rs en la corteza prefrontal es mucho mayor (más de 20 veces) que la de los D_2Rs y están localizados principalmente en las dendritas y espinas de las células piramidales (Bergson et al., 1995; Goldman-Rakic et al., 2000; Smiley et al., 1994). Múltiples estudios han demostrado el papel del D_1R tanto en la promoción de la plasticidad sináptica como en la mediación de la disfunción cognitiva a través de cascadas de señalización que implican la producción de cAMP y activación de PKA, DARPP-32 y CREB, de manera que, en función del nivel de activación de los D_1Rs, se promueve la plasticidad sináptica y neuroprotección o bien la inducción de vías apoptóticas (Hotte et al., 2006; Puig et al., 2014; Schapira, 2002; Yao et al., 2008). La regulación de la transmisión glutamatérgica y la inducción de LTP por parte de los D_1Rs en la corteza prefrontal y en el hipocampo, ambas regiones con un papel central en el aprendizaje y la memoria, tendría como principales ejecutores a los heterómeros D_1R-NMDAR (Gurden et al., 2000). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que en realidad se produce de forma cooperativa con los D_2Rs (Puig et al., 2014), por lo que los heterómeros D_2R-NMDAR también podrían tener protagonismo en estos procesos (Wang et al., 2012). Aun así, actualmente se considera al D_1R, mediante su interacción con el NMDAR, como principal sustrato de regulación de la plasticidad sináptica debido a la gran cantidad de evidencias a favor, incluida su localización en las espinas dendríticas. Por lo que respecta a la interacción D_1R-NMDAR, un estudio quiso comprobar su importancia funcional en los procesos de memoria y, mediante la aplicación de un péptido

sintético que mimetiza la región t2 del CTD del D_1R, se consiguió romper la interacción D_1R-GluN1 y resultó en una inhibición de la LTP dependiente de NMDAR en el hipocampo de ratón, además de impedir la memoria de trabajo en estos animales (Nai et al., 2010). Por otro lado, el hecho de que mediante la interacción D_1R-NMDAR sea posible regular la difusión lateral de D_1R y NMDAR y con ello la neurotransmisión excitatoria, constituye para la neurona un mecanismo rápido y energéticamente asequible para integrar las señales dopaminérgicas y glutamatérgicas y promover la adaptación sináptica (Ladépêche et al., 2013) (véase apartado 1.5.4 Interacción del receptor NMDA con otros receptores: heterómeros NMDAR-D_1R).

En relación con la AD, muy frecuentemente se han reportado alteraciones en el sistema dopaminérgico, relacionadas con síntomas cognitivos y, en algunos casos, también motores, que se asocian con un pronóstico negativo en la evolución de la enfermedad (Martorana and Koch, 2014). Estas alteraciones dopaminérgicas incluyen niveles reducidos de dopamina y de sus receptores, particularmente de D_1R y D_2R en la corteza prefrontal e hipocampo en fases iniciales y de D_2R en el NAcc en fases más avanzadas de la enfermedad, en este último caso acompañado de la reducción en la expresión de DAT y TH (Kumar and Patel, 2007; Murray et al., 1995; Xu et al., 2012). Se cree que los daños producidos en el hipocampo son la principal causa de pérdida de memoria en la AD. Una de las fuentes de dopamina en el hipocampo, donde este neurotransmisor modula la plasticidad sináptica y la codificación de la memoria (Broussard et al., 2016; McNamara et al., 2014), proviene de las neuronas dopaminérgicas de la VTA, las cuales también proyectan al NAcc y la corteza prefrontal, mediando el control de la motivación y la recompensa (Russo and Nestler, 2013). Estudios neuropatológicos *postmortem* en cerebros humanos con AD demostraron que las conexiones hacia el hipocampo, tanto corticales como subcorticales, estaban alteradas a muchos niveles, sugiriendo que las progresivas alteraciones estructurales podían también contribuir al empeoramiento de la memoria y las funciones cognitivas en pacientes con AD (Van Hoesen and Hyman, 1990). Con el fin de establecer la causa de la afectación de la transmisión dopaminérgica en el hipocampo y el NAcc, mediante un estudio muy reciente con ratones modelo de AD se descubrió que en la VTA se producía una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas a partir de los 3 meses de edad, antes de la formación de placas amiloides, sin verse afectada la SNc adyacente. Además, detectaron que el flujo de dopamina en el hipocampo y el NAcc se veía reducido, hecho que contribuiría tanto a los síntomas cognitivos como no cognitivos. Al tratar estos ratones con L-DOPA se rescató completamente la plasticidad sináptica y la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales CA1 y se restauró la composición de la PSD y los déficits de memoria, demostrando así que las alteraciones en la VTA tienen un papel crucial en la patofisiología de la AD en estadios previos a la formación de las placas amiloides (Nobili et al., 2017).

Aunque no se conoce con certeza la causa primera que origina la disfunción dopaminérgica, la hipótesis más aceptada actualmente sugiere un papel causativo a los oligómeros Aβ. Estudios recientes en los que se inyectó oligómeros Aβ a ratones *wild type* reportaron que provocaban la disminución de los niveles de dopamina y transformaba la LTP cortical en LTD, causando disfunción en la memoria (Moreno-Castilla et al., 2016), y que el tratamiento con un agonista de D_1R protegía la LTP en neuronas hipocampales CA1 de la acción deletérea de los oligómeros de Aβ (Yuan Xiang et al., 2016). En cuanto al inicio de esta disfunción dopaminérgica que se produce en etapas iniciales de la AD, mediada por oligómeros Aβ, se cree que se debe a la unión prolongada de estos oligómeros a los α7-nAchR presinápticos y el consecuente impedimento en la liberación de glutamato y GABA, reduciendo la posibilidad de la liberación de dopamina en la corteza prefrontal y el hipocampo y contribuyendo a los déficits de atención y memoria característicos de fases iniciales de la AD. La progresiva disminución de la liberación de glutamato desde la corteza prefrontal reducirá a su vez el estímulo para la liberación de dopamina también en el NAcc, causando la apatía e hipoactividad motora característica de fases más

avanzadas de la enfermedad (Martorana and Koch, 2014; Posadas et al., 2013; Wang et al., 2000), así como la degeneración de esta región cerebral (Pievani et al., 2013). En conjunto, la disfunción dopaminérgica por déficit de dopamina y de D_1Rs estaría claramente implicada en la falta de regulación de la plasticidad sináptica inducida por NMDARs y contribuiría claramente, junto con la degeneración inducida por la activación de NMDARs extrasinápticos por parte de oligómeros de Aβ, al declive cognitivo en la AD.

Las alteraciones dopaminérgicas en el cerebro, además de afectar a la liberación de otros neurotransmisores, también conllevan cambios en la expresión de los NMDARs y viceversa, debido a la mutua regulación consecuencia de su heteromerización. En pacientes con AD, los niveles de NMDARs se ven muy disminuidos en el hipocampo y el NAcc, mientras que en capas profundas de la corteza prefrontal se han detectado incrementos (Fang et al., 2005). Concretamente en el hipocampo, se detectó que los niveles de mRNA de las subunidades GluN2A y GluN2B estaban disminuidos, mientras que los niveles de la subunidad GluN1 no se veían alterados (Tsang et al., 2008). Como se ha comentado extensamente en el apartado anterior, la composición de las subunidades del NMDAR y la localización determinan la capacidad de los oligómeros de Aβ de provocar neurodegeneración, siendo los NMDARs extrasinápticos y con predominio de la subunidad GluN2B los que representan el principal mediador de la excitotoxicidad y disfunción sináptica inducida por los oligómeros Aβ (Tackenberg et al., 2013; Zhang et al., 2016). Por esta razón, el fármaco que por el momento ha mostrado ser más efectivo, aunque no en todos los pacientes, es el antagonista no competitivo del NMDAR memantine, capaz de bloquear el estrés oxidativo promovido por los oligómeros Aβ y de preservar la activación sináptica transitoria fisiológica de los NMDARs (Danysz and Parsons, 2012)

Se conoce mucho menos acerca del papel específico del sistema histaminérgico en la cognición humana y, por consiguiente, en la disfunción cognitiva, pero se han encontrado evidencias de alteraciones en este sistema en pacientes con AD (Hu and Chen, 2017). Los niveles de histamina y sus metabolitos están incrementados en el líquido cefalorraquídeo de la corteza prefrontal, la corteza temporal, los ganglios basales y el hipocampo, aunque otros han reportado una disminución de estos niveles (Shan et al., 2015). Una alteración que parece ser común en pacientes con AD es la degeneración (~50%) de las neuronas del TMN rostral (Nakamura et al., 1993; Shan et al., 2015), mientras que no se ha detectado una disminución en la expresión de receptores de histamina. Este último hecho se cree consecuencia de una compensación por parte de las neuronas restantes, ya que tan solo se aprecia una disminución del ~24% de la enzima HDC (Nieto-Alamilla et al., 2016). Con respecto al H_3R, se ha demostrado que antagonistas de este receptor palian las deficiencias cognitivas y revierten la hiperfosforilación de tau en el hipocampo y la médula espinal de ratones modelo de AD (Bardgett et al., 2011; Bitner et al., 2011). Dado que los pacientes de AD sufren de una disfunción colinérgica evidente, la protección por parte de los antagonistas de H_3R podría deberse a la desinhibición de la liberación de Ach al actuar sobre heterorreceptores. Otros mecanismos podrían consistir en promover la síntesis y la liberación de histamina, ya que es reconocida la implicación de la histamina en las funciones cognitivas (Alvarez, 2009), así como promover la neurogénesis (Bernardino et al., 2012) y/o prevenir la muerte celular inducida por los oligómeros de Aβ (Fu et al., 2010). El mecanismo molecular que subyace a la prevención por parte del H_3R en la muerte celular inducida por los oligómeros de Aβ, que se cree ocurre a través de la activación de NMDARs extrasinápticos, es uno de los objetos de estudio de esta Tesis Doctoral y concretamente ha sido abordado en el tercer Objetivo. En los últimos años, diversos estudios clínicos en fase II con antagonistas de H_3R, incluidos ABT-288, MK-0249 y GSK239512, han llevado a la investigación de la eficacia y seguridad de estos antagonistas para tratar los síntomas cognitivos de pacientes con AD. El ligando GSK239512 mostró buena tolerancia y una mejora en la función cognitiva

en pacientes con MCI (Nathan et al., 2013), mientras que en pacientes con AD mostró mejoras en la memoria episódica pero no en la memoria de trabajo (Grove et al., 2014). Otros ensayos clínicos con antagonistas de H_3R han resultado menos prometedores, por lo que actualmente los esfuerzos se centran en el estudio de la capacidad del H_3R de regular otros aspectos de la AD además de los cognitivos, así como en profundizar en la comprensión de los mecanismos de acción de los ligandos a nivel molecular.

2. OBJETIVOS

Actualmente está plenamente aceptado que los receptores acoplados a proteína G (GPCR) de una misma o distinta familia pueden interactuar entre sí formando homo- o heterooligómeros, así como con otras proteínas moduladoras, adquiriendo el complejo nuevas propiedades farmacológicas y funcionales (*fingerprint* molecular y bioquímico) distintas a las de los protómeros que lo componen cuando actúan por separado. Por consiguiente, los heterómeros de receptores se consideran nuevas dianas farmacológicas teniendo en cuenta su posible especificidad de localización y sus características bioquímicas únicas, entre ellas las modulaciones alostéricas. Estas modulaciones pueden presentarse por la interacción entre los protómeros del complejo y también por la de éstos con las proteínas G, teniendo como posibles consecuencias el reconocimiento diferencial de ligandos, la modulación del tráfico intracelular y la modulación del acoplamiento a proteínas señalizadoras. Así, un mismo receptor puede modular una gran variedad de procesos dependiendo de su localización o interacción con otras proteínas, hecho que incrementa su complejidad farmacológica y funcional.

La histamina y la dopamina son neurotransmisores que regulan procesos cerebrales de gran complejidad, tanto voluntarios como involuntarios. La histamina es capaz de modular la actividad locomotora, las emociones, los procesos cognitivos, el sueño y los ritmos circadianos, la percepción del dolor, la homeostasis energética y la respiración. Muchos de estos procesos son también regulados por la dopamina, lo que sugiere la necesidad de un equilibrio y comunicación entre ambos sistemas de neurotransmisión. Recientemente, ha sido descrita la existencia de heterómeros formados por los receptores de histamina H_3 (H_3R) y los receptores de dopamina D_1 (D_1R), ambos GPCRs, así como las características bioquímicas de dichos complejos. Entre ellas, cabe destacar la capacidad del H_3R de inhibir ciertas vías de señalización celulares mediadas por el D_1R, cuando ambos receptores se expresan postsinápticamente. A nivel de conectividad cerebral, se ha propuesto que el heterómero D_1R-H_3R trabajaría como un procesador que integra señales inducidas por dos neurotransmisores distintos, la dopamina y la histamina, incluso las que recibe en un mismo intervalo de tiempo.

Teniendo en cuenta estas evidencias, la **Hipótesis** planteada en esta Tesis Doctoral fue que los ligandos del receptor de histamina H_3 podrían ser capaces de modular al receptor de dopamina D_1 y a otros receptores que interaccionen con él, y que esta modulación podría tener implicaciones terapéuticas para el tratamiento de diversos desórdenes neurológicos en los que estos receptores se ven implicados.

Así, el **Objetivo General** de esta Tesis ha sido estudiar las interacciones alostéricas entre los receptores de dopamina D_1 y los de histamina H_3 y sus isoformas, así como su interacción con los receptores sigma-1 y NMDA y sus implicaciones en diversos desórdenes neurológicos, como la adicción a cocaína, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Alzheimer, empleando modelos celulares y animales de dichas enfermedades.

Los receptores de dopamina están implicados en el control del sistema de recompensa y, en condiciones normales, existe un delicado equilibrio entre las señales de búsqueda de la recompensa, controladas por neuronas que expresan D_1R, y las señales de aversión, procedentes de neuronas que expresan receptores de dopamina D_2. La cocaína es capaz de perturbar este equilibrio alterando la señalización de estas dos vías de manera que domine la promovida por los D_1Rs. Esto lo consigue en gran parte por su unión al transportador de dopamina DAT y su consecuente inhibición, incrementando los niveles de dopamina en las sinapsis, así como por su unión al receptor sigma-1 (σ_1R), el cual a su vez modula a los receptores de dopamina. Basándonos en que el D_1R ha mostrado su capacidad de heteromerizar tanto con el σ_1R como con el H_3R en el núcleo estriado, y teniendo en cuenta que muchos de los efectos de la cocaína son mediados por el D_1R en el heterómero σ_1R-D_1R, el primer objetivo de esta Tesis ha sido:

Objetivo 1. **Explorar si los receptores de dopamina D_1 y los receptores de histamina H_3 pueden formar complejos heterotriméricos con el receptor sigma-1 e investigar si la capacidad del receptor H_3 de inhibir la señalización del receptor D_1, mediada por su heteromerización, puede ser utilizada para reducir los efectos que la cocaína ejerce tras su unión al receptor sigma-1.**

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la aparición de corea progresiva, deterioro cognitivo y perturbaciones emocionales. En etapas tempranas de esta enfermedad también se ha observado una sobreactivación de D_1Rs que provoca un desequilibrio en la transmisión dopaminérgica y finalmente muerte celular. Basándonos en la capacidad del H_3R de modular negativamente la señalización del D_1R, se planteó la hipótesis de que el heterómero D_1R-H_3R puede ser una diana terapéutica para prevenir daños asociados a esta enfermedad. Para comprobar esta hipótesis, se planteó el segundo objetivo de esta Tesis:

Objetivo 2. Investigar la formación de heterómeros de receptores de dopamina D_1 y de histamina H_3, así como analizar la capacidad de ligandos específicos del receptor H_3 de modular la señalización y la muerte celular inducida por la sobreactivación de receptores D_1, en un modelo celular y animal de la enfermedad de Huntington.

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio mayoritario en el SNC y ha mostrado ser capaz de promover la plasticidad neuronal, siempre que sea liberado a concentraciones adecuadas. Un exceso de glutamato, al igual que ocurre con la dopamina, puede provocar muerte celular por excitotoxicidad y se ha asociado con la disfunción neuronal y neurodegeneración presentes en la enfermedad de Alzheimer, concretamente por la sobreactivación crónica de receptores glutamatérgicos de NMDA (NMDAR) extrasinápticos. Se trata de canales de calcio regulados por ligando y dependientes de voltaje, constituidos por el ensamblaje de cuatro subunidades proteicas, la naturaleza de las cuales determina las características farmacológicas y funcionales del canal. Considerando que el NMDAR puede heteromerizar con el D_1R, que ambos han mostrado capacidad para regularse mutuamente y que el H_3R es capaz de modular a su vez la señalización del D_1R, se planteó el tercer objetivo de esta Tesis:

Objetivo 3. Explorar si los receptores de dopamina D_1 y los receptores de histamina H_3 pueden formar complejos heterotriméricos con el receptor glutamatérgico de NMDA e investigar si el receptor H_3 es capaz de modular al receptor de NMDA y/o al receptor D_1 en estos complejos, con la finalidad de encontrar una aproximación farmacológica capaz de disminuir la excitotoxicidad causante de muerte celular en la corteza cerebral de rata y de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer.

El conjunto de resultados derivados de los objetivos anteriormente expuestos pone de manifiesto que los heterómeros D_1R-H_3R son una diana potencial para el tratamiento de diversos trastornos neurológicos. Con el propósito de conocer con mayor profundidad esta interacción a nivel molecular, el subtipo de proteínas G implicadas y encontrar ligandos del H_3R que modulen eficientemente la funcionalidad del D_1R, se planteó el cuarto objetivo de esta Tesis:

Objetivo 4. Comprobar una biblioteca de ligandos del receptor de histamina H_3 como potenciales moduladores alostéricos del receptor de dopamina D_1 en el heterómero de receptores D_1-H_3, así como estudiar la interacción de éste heterómero con proteínas Gαs y Gαi y analizar si existen diferencias en el acoplamiento a distintos subtipos de proteínas Gαi por parte del homómero de receptores H_3-H_3 o del heterómero de receptores D_1-H_3.

En base a la existencia de múltiples isoformas humanas del receptor H_3R, con distinta distribución cerebral y farmacología y a la posibilidad de que muchos de los efectos observados *in vivo* se deban a la activación no únicamente de las isoformas mayoritarias sino de múltiples isoformas del receptor H_3, se planteó el quinto objetivo de esta Tesis:

Objetivo 5. Explorar la funcionalidad de distintas isoformas humanas del receptor de histamina H_3, así como su capacidad para formar heterómeros con el receptor de dopamina D_1 y/o el receptor glutamatérgico de NMDA con posibles propiedades bioquímicas específicas.

3. RESULTADOS

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular
Facultat de Biologia
Av. Diagonal, 643
Edifici Prevosti planta -2
08028 Barcelona
Tel. +34 934021523
Fax +34 934021559

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

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

Manuscrito publicado en *Journal of Neuroscience, 2014*, *34*: 3545–3558

3.2 David Moreno-Delgado*, Mar Puigdellívol*, Estefanía Moreno, **Mar Rodríguez-Ruiz**, Joaquín Botta, Paola Gasperini, Anna Chiarlone, Lesley A. Howell, Marco Scarselli, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Manuel Guzmán, Carme Lluís, Jordi Alberch, Enric I. Canela, Sílvia Ginés*, Peter J. McCormick*. **Modulation of dopamine D_1 receptors via histamine H_3 receptors represents a novel therapeutic target for Huntington's disease.**

Manuscrito en revisión en *Journal of Clinical Investigation, 2018*

3.3 **Mar Rodríguez-Ruiz*,** Estefanía Moreno*, David Moreno-Delgado*, Gemma Navarro, Josefa Mallol, Antonio Cortés, Carme Lluís, Enric I. Canela, Vicent Casadó*, Peter J. McCormick*, Rafael Franco*. **Heteroreceptor complexes formed by dopamine D_1, histamine H_3, and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors as targets to prevent neuronal death in Alzheimer's disease.**

Manuscrito publicado en *Molecular Neurobiology, 2017, 54:* 4537

3.4 **Mar Rodríguez-Ruiz**, Antonio Castellanos-Martínez, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Enric. I. Canela, Estefanía Moreno*, Vicent Casadó*. **Allosteric and functional modulation of dopamine D_1 receptors by targeting histamine H_3 receptors within the D_1-H_3 receptor heteromer.**

Manuscrito preparado para su revisión en *Neuropharmacology, 2018*

3.5 **Mar Rodríguez-Ruiz**, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Enric. I. Canela, Estefanía Moreno*, Vicent Casadó*. **Human histamine H_3 receptor isoform bias: modulation by heteromerization with dopamine D_1 receptors.**

Manuscrito preparado para su revisión en *ACS Chemical Biology, 2018*

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular
Facultat de Biologia

Av. Diagonal, 643
Edifici Prevosti planta -2
08028 Barcelona

Tel. +34 934021523
Fax +34 934021559

Vicent Casadó Burillo y Estefanía Moreno Guillén
Grupo de Neurobiología Molecular
Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular
Av. Diagonal, 643
Edificio Prevosti, Planta-2
08028 Barcelona

La tesis doctoral de Maria del Mar Rodríguez Ruiz **"Heterómeros de receptores de dopamina D_1 y de histamina H_3 como potenciales dianas terapéuticas en trastornos adictivos y enfermedades neurodegenerativas"** se presenta como un compendio de publicaciones.

En el apartado de **RESULTADOS** se presentan los siguientes trabajos:

El manuscrito "**Cocaine disrupts histamine H_3 receptor modulation of dopamine D_1 receptor signaling: σ_1-D_1-H_3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects**" ha sido publicado en *Journal of Neuroscience.* Esta revista tiene un factor de impacto de 6.344 y se encuentra en el primer decil (25/252), del área *Neurosciences*. El manuscrito "**Modulation of dopamine D_1 receptors via histamine H_3 receptors represents a novel therapeutic target for Huntington's disease**" ha sido enviado a *Journal of Clinical Investigation.* El manuscrito "**Heteroreceptor complexes formed by dopamine D_1, histamine H_3, and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors as targets to prevent neuronal death in Alzheimer's disease**" ha sido publicado en *Molecular Neurobiology,* revista con un factor de impacto de 5.397, que se encuentra en el primer cuartil (32/256), dentro del área *Neurosciences*. El manuscrito "**Allosteric and functional modulation of dopamine D_1 receptors by targeting histamine H_3 receptors within the D_1-H_3 receptor heteromer**" está preparado para su revisión en *Neuropharmacology y* el manuscrito "**Human histamine H_3 receptor isoform bias: modulation by heteromerization with dopamine D_1 receptors**" está preparado para su revisión en *ACS Chemical Biology*.

En el trabajo "**Cocaine disrupts histamine H_3 receptor modulation of dopamine D_1 receptor signaling: σ_1-D_1-H_3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects**", la doctoranda Maria del Mar Rodríguez Ruiz ha realizado los experimentos de determinación del reclutamiento de β-arrestinas y los de determinación de muerte celular en tejido junto con el Dr. David Moreno-Delgado.
En el manuscrito "**Modulation of dopamine D_1 receptors via histamine H_3 receptors represents a novel therapeutic target for Huntington's disease**", la doctoranda Maria del Mar Rodríguez Ruiz ha realizado los experimentos de funcionalidad y viabilidad en células y cultivos organotípicos, y los experimentos de internalización.
En el manuscrito "**Heteroreceptor complexes formed by dopamine D_1, histamine H_3, and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors as targets to prevent neuronal death in Alzheimer's disease**" la doctoranda Maria del Mar Rodríguez Ruiz es co-primer autor del trabajo junto con la Dra. Estefanía Moreno y el Dr. David Moreno-Delgado. La doctoranda ha

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular
Facultat de Biologia
Av. Diagonal, 643
Edifici Prevosti planta -2
08028 Barcelona
Tel. +34 934021523
Fax +34 934021559

realizado la totalidad del trabajo experimental exceptuando los experimentos de *In Situ Proximity Ligation Assay* (PLA) y de co-inmunoprecipitación.

En el trabajo "**Allosteric and functional modulation of dopamine D_1 receptors by targeting histamine H_3 receptors within the D_1-H_3 receptor heteromer**", la doctoranda Maria del Mar Rodríguez Ruiz ha realizado la totalidad del trabajo experimental y ha participado en la elaboración del manuscrito. Los experimentos de CODA-RET fueron realizados por la doctoranda durante una estancia en el laboratorio de investigación del Dr. Sergi Ferré en el *National Institute on Drug Abuse*, perteneciente al *National Institutes of Health* en Baltimore, Maryland (U.S.A.).

En el trabajo "**Human histamine H_3 receptor isoform bias: modulation by heteromerization with dopamine D_1 receptors**", la doctoranda Maria del Mar Rodríguez Ruiz ha realizado la totalidad del trabajo experimental, exceptuando los experimentos de BRET entre las isoformas del receptor H_3 y el receptor D_1 y de reclutamiento de β-arrestinas, y ha participado en la elaboración del manuscrito.

En el apartado de **ANEXOS** se presenta:

El manuscrito "**Targeting the dopamine D_3 receptor: an overview of drug design strategies"** ha sido publicado en *Expert Opinion on Drug Discovery,* revista con un factor de impacto de 3.804 que se encuentra en el primer cuartil, (62/253), del área *Pharmacology and Pharmacy*.

Barcelona, a 15 de Junio de 2018

Dr. Vicent Casadó Burillo

Dra. Estefanía Moreno Guillén

3.1 La cocaína impide la modulación que el receptor H_3 de histamina ejerce sobre el receptor D_1 de dopamina: complejos de receptores σ_1-D_1-H_3 como dianas clave para reducir los efectos de la cocaína

Estefanía Moreno, David Moreno-Delgado, Gemma Navarro, Hanne M. Hoffmann, Silvia Fuentes, Santi Rosell-Vilar, Paola Gasperini, **Mar Rodríguez-Ruiz**, Mireia Medrano, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Vicent Casadó, Carme Lluís, Sergi Ferré, Jordi Ortiz, Enric I Canela*, Peter McCormick*

*Contribuyeron igualmente

Artículo publicado en *The Journal of Neuroscience,* 5 March 2014, 34(10): 3545-3558. doi:10.1523/JNEUROSCI.4147-13.2014

Los efectos generales de la cocaína no se conocen muy bien a nivel molecular, aunque sí se sabe que los receptores D_1 de dopamina juegan un papel importante. En este trabajo mostramos que un mecanismo clave puede consistir en el bloqueo de la acción inhibitoria que el receptor H_3 ejerce sobre el receptor D_1. Este bloqueo requiere el receptor σ_1 y ocurre tras la unión de la cocaína a los complejos σ_1-D_1-H_3. La disrupción inducida por la cocaína deja a un receptor D_1 desinhibido que activa G_s, recluta libremente β-arrestina, aumenta los niveles de p-ERK 1/2 e induce muerte celular cuando es sobreactivado. Mediante ensayos *in vitro* en células transfectadas y experimentos *ex vivo* con ratas tratadas de forma aguda o autoadministradas con cocaína, junto con ratones con depleción del receptor σ_1, mostramos que el bloqueo de receptores σ_1 con un antagonista restaura el freno protector mediado por el receptor H_3 sobre la señalización del receptor D_1 y previene la muerte celular originada por una elevada señalización del receptor D_1. Estos hallazgos sugieren que la terapia combinada de antagonistas de σ_1 con agonistas de H_3 podrían servir para reducir algunos efectos de la cocaína.

Cellular/Molecular

Cocaine Disrupts Histamine H_3 Receptor Modulation of Dopamine D_1 Receptor Signaling: σ_1-D_1-H_3 Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects

Estefanía Moreno,[1,2,3] David Moreno-Delgado,[1,2,3] Gemma Navarro,[1,2,3] Hanne M. Hoffmann,[4] Silvia Fuentes,[4] Santi Rosell-Vilar,[4] Paola Gasperini,[1,2,3] Mar Rodríguez-Ruiz,[1,2,3] Mireia Medrano,[1,2,3] Josefa Mallol,[1,2,3] Antoni Cortés,[1,2,3] Vicent Casadó,[1,2,3] Carme Lluís,[1,2,3] Sergi Ferré,[5] Jordi Ortiz,[4] Enric Canela,[1,2,3]* and Peter J. McCormick[1,2,3,6]*

[1]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), [2]Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB) and [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, 08028 Spain, [4]Neuroscience Institute and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Universitat Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain, [5]National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland 21224, and [6]School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom NR4 7TJ

The general effects of cocaine are not well understood at the molecular level. What is known is that the dopamine D_1 receptor plays an important role. Here we show that a key mechanism may be cocaine's blockade of the histamine H_3 receptor-mediated inhibition of D_1 receptor function. This blockade requires the σ_1 receptor and occurs upon cocaine binding to σ_1-D_1-H_3 receptor complexes. The cocaine-mediated disruption leaves an uninhibited D_1 receptor that activates G_s, freely recruits β-arrestin, increases p-ERK 1/2 levels, and induces cell death when over activated. Using *in vitro* assays with transfected cells and in *ex vivo* experiments using both rats acutely treated or self-administered with cocaine along with mice depleted of σ_1 receptor, we show that blockade of σ_1 receptor by an antagonist restores the protective H_3 receptor-mediated brake on D_1 receptor signaling and prevents the cell death from elevated D_1 receptor signaling. These findings suggest that a combination therapy of σ_1R antagonists with H_3 receptor agonists could serve to reduce some effects of cocaine.

Introduction

The striatum is involved in the learning and elicitation of reward-related behaviors. GABAergic striatal medium sized spiny neurons (MSNs) comprise ~95% of striatal neurons and receive two main extrinsic inputs, cortical-limbic-thalamic glutamatergic and mesencephalic dopaminergic, converging in the dendritic spines of the MSNs (Ferré et al., 2007). There are two distinct MSNs, giving rise to two efferent pathways of the basal ganglia, the striatonigral MSN or direct pathway and the striatopallidal MSN or the indirect pathway. These neurons selectively express dopamine D_1 (D_1R) and D_2 (D_2R) receptors, respectively. The initiation of movement leads to dual input of these two pathways (Cui et al., 2013). Despite the dual input, it is the balance of both types of MSNs that determines the final striatal output and the facilitation and inhibition of specific motor responses involved in reward-related behavior (Gerfen and Surmeier, 2011). Drugs of abuse are able to subvert these balanced inputs by altering the cell signaling of striatopallidal and striatonigral MSN. In the case of cocaine, it binds to and inhibits the dopamine transporter (DAT) producing a large increase in extracellular dopamine (Williams and Galli, 2006). This is associated with an increase in D_1R signaling while D_2R density is decreased, tipping the balance of signaling toward the direct pathway (Pascoli et al., 2012; Volkow et al., 2013). Our work suggests that the role of D_1R in cocaine's effects depends on the ability of σ_1 receptors (σ_1R) to bind and differentially modulate D_1R and D_2R in both MSNs (Navarro et al., 2010, 2013). Cocaine, especially in the form of crack, is associated with toxic consequences such as seizures and death. The biochemical alterations that follow the intake of cocaine are not well understood, but several studies indicate that D_1R is involved in cocaine's effects (Ritz and George, 1997; Aksenov et al., 2006; Lepsch et al., 2009).

In addition to glutamatergic and dopaminergic inputs, the striatum receives hypothalamic histaminergic input, which releases histamine from asynaptic varicosities (Takagi et al., 1986).

Received Sept. 27, 2013; revised Jan. 16, 2014; accepted Jan. 27, 2014.

Author contributions: E.M., D.M.-D., S. Fuentes, P.G., V.C., C.L., S. Ferré, J.O., P.J.M., and E.C. analyzed data; E.M., D.M.-D., C.L., S. Ferré, J.O., and P.J.M. wrote the paper; S. Fuentes, J.M., S. Ferré, and E.C. contributed unpublished reagents/analytic tools. E.M., D.M.-D., P.G., V.C., C.L., J.O., P.J.M., and E.C. designed research; E.M., D.M.-D., G.N., H.M.H., S. Fuentes, S.R.-V., P.G., M.R.-R., M.M., A.C., and V.C. performed research.

This study was supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2010-18472, SAF2011-23813, SAF2006-08240, SAF2009-12510, and Red de Trastornos Adictivos RD06/0001/0015) and by Intramural Funds of the National Institute on Drug Abuse to S. Ferré. P.J.M. is a Ramón y Cajal Fellow. We thank Jasmina Jiménez for technical help (University of Barcelona). We thank Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain) for providing σ1 receptor KO and WT mice brains.

*E.C. and P.J.M. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Peter J. McCormick, School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, UK NR4 7TJ. E-mail: p.mccormick@uea.ac.uk.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4147-13.2014

Copyright © 2014 the authors 0270-6474/14/343545-14$15.00/0

Histamine H_3 receptors (H_3R) are highly expressed presynaptically and postsynaptically in the striatal spine module (Ellenbroek, 2013; Panula and Nuutinen, 2013) and mostly localized postsynaptically in both types of MSN where they can control the D_1R signaling through the formation of D_1R-H_3R receptor heteromers (Moreno et al., 2011a; Ellenbroek, 2013; Panula and Nuutinen, 2013). This heteromer acts as a relay where activated H_3R can serve as a "molecular brake" for D_1R signaling. This effect is reached through a molecular protein-protein interaction between receptors in the heteromer. This is a common biochemical property of receptor heteromers, and it is defined as an intermolecular interaction by which the presence of one receptor, or the ligand binding to one receptor unit in the heteromer, changes positively or negatively the binding and/or the functional properties of another receptor unit in the heteromer (Ferré et al., 2009). These interprotomer interactions or cross-talk have been described for D_1R-H_3R heteromers upon heteromer coactivation with agonists(Ferrada et al., 2009). Thus, through a negative cross-talk between receptors, H_3R agonist decreases the D_1R agonist affinity and signaling. Some receptor heteromers, including D_1R-H_3R heteromers, have been found to display cross-antagonism, the ability of an antagonist of one receptor to also antagonize the signaling of the partner receptor (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011b; González et al., 2012). Cross-antagonism requires heteromer formation for any cross-receptor effects as antagonists do not signal on their own. Thus, cross-antagonism can be used as a fingerprint for identification of the presence of the heteromer (Ferré et al., 2009). In this frame here we explore a new physiological role for D_1R-H_3R heteromers with the idea of using the H_3R-mediated inhibitory effects of D_1R signaling to dampen cocaine's effects. We found that H_3R activation blocks D_1R agonist-mediated cell death in striatal organotypic cultures. We discovered a potentially key biochemical mechanism involved in the effects of cocaine. Cocaine strongly disrupts D_1R-H_3R heteromer function, including the neuroprotective effects of H_3R activation in the D_1R-H_3R heteromer. We thus propose the association of σ_1R antagonists with H_3 receptor agonists as a therapeutic approach for cocaine abuse.

Materials and Methods

Animals, cocaine acute treatment, and cocaine self-administration. All animal protocols were in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC and approved by the Ethics Committee for Human and Animal Research of the Universitat Autònoma de Barcelona. A maximal effort was made to minimize the number and suffering of animals. Male Sprague Dawley rats were obtained from the Animal Service, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. To obtain rats self-administered with cocaine, our protocol exhaustively described previously (Hoffmann et al., 2012) was used. To obtain rats acutely treated with cocaine, rats (6–11 weeks old) were conditioned to handling during previous days to a single 15 mg/kg cocaine intraperitoneal injection (free base) dissolved in saline. As naive rats, 9- to 11-week-old rats (±350 g) were housed in a temperature (21 ± 1°C) and humidity-controlled (55 ± 10%) room with a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. In all cases, 4% isoflurane (2-chloro-2- (difluoromethoxy)-1,1,1-trifluoro-ethane) anesthetized animals were killed by decapitation to obtain rat brains. Brains from wild-type (WT) littermates and σ_1R knock-out (KO) CD1 albino Swiss male mice (8 weeks old, 25 g) were generously provided by Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain). The characterization of these mice has been previously described (Langa et al., 2003). Cocaine-HCl was purchased from Spanish Agencia del Medicamento #2003C00220.

Striatal slices preparation. Mouse or rat brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O_2/CO_2: 95%/5%) Krebs-HCO_3^- buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4, 1.5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$, 10 mM glucose and 26 mM $NaHCO_3$, pH 7.4). The brains were sliced perpendicularly to the long axis of the striatum at 4°C using a brain matrix (Zivic Instruments). Slices (500 μm thick) were kept at 4°C in Krebs-HCO_3^- buffer during the dissection. Each striatal slice was transferred into an incubation tube containing 1 ml of ice-cold Krebs-HCO_3^- buffer. The temperature was raised to 23°C and after 30 min, the media was replaced by 2 ml of fresh Krebs-HCO_3^- buffer (23°C). The slices were incubated under constant oxygenation (O_2/CO_2: 95%/5%) at 30°C for 4–5 h in an Eppendorf Thermomixer (5 Prime). The media was replaced by 200 μl of fresh Krebs-HCO_3^- buffer and incubated for 30 min before the addition of any agent. Slices were treated or not with the indicated ligand for the indicated time. After the indicated incubation period, the solution was discarded, and slices were frozen on dry ice and stored at −80°C.

Organotypic striatal slice cultures and cell death determination. Coronal striatal slices (500 μm thickness) from 7- to 8-week-old rats were obtained using a brain matrix and cultured in Neurobasal medium supplemented with 20% horse serum, 0.5% B27, 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100), and 100 U/ml penicillin/streptomycin (all supplements were from Invitrogen). After 24 h, culture medium was replaced by fresh medium containing no ligands or the indicated concentrations of the σ_1R ligands cocaine or PRE-084. After 1 h, medium, SCH 23390, imetit, or thioperamide were added at the indicated concentrations and incubated for an additional 1 h before the addition of D_1R agonist. Slices were maintained 48 h more in culture. When the σ_1R antagonist PD 144418 was used it was added 1 h before the addition of cocaine. After the total 72 h of culture, 10 μM propidium iodide (PI) was added and maintained at 37°C for 1 h, then slices were washed twice in cold-PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at 4°C. Slices were stained with Hoechst 1:1000 and total and PI-positive nuclei were quantified using Leica SP2 confocal microscope (20×; UV, 561 lasers) and the quantification program Image-based Tool for Counting Nuclei for ImageJ.

Cell culture, expression vectors, and transient transfection. Human neuroblastoma SK-N-MC cell clone expressing human D_1R and H_3R was developed and grown as previously described (Ferrada et al., 2009) Human embryonic kidney (HEK293T) cells were grown in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100), and 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum. For transfection, sequences encoding fusion proteins H_3R-Rluc, D_1R-Rluc, σ_1R-YFP, H_3R-YFP, D_1R-YFP, and σ_1R-GFP^2, which correspond with the human receptors fused to *Renilla luciferase* (Rluc) or to fluorescent proteins YFP or GFP^2 on the C-terminal end of the receptor, were obtained and characterized as previously described (Ferrada et al., 2009; Navarro et al., 2010, 2013). Cells were transiently transfected with the corresponding fusion protein cDNA by the ramified polyethylenimine (PEI; Sigma) method (Ferrada et al., 2009; Navarro et al., 2010, 2013) or by the lipofectamine (Invitrogen) method, in transfections where siRNA was present, following the instructions of the supplier. siRNA that targets both human and rodent σ_1R RNA and a scrambled control siRNA were purchased from Invitrogen (catalog #HSS 145543). To control the cell number, sample protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad) using bovine serum albumin (BSA) dilutions as standards.

Lentivirus production and cell transduction. Silencing lentiviral vectors were produced by cotransfecting HEK293 cells with lentiviral silencing plasmids GIPZ Human SIGMAR1 shRNA (Clone Id:V3LHS_377499 or V3LHS_406026; Thermo Scientific) with packing plasmid psPAX2 and envelope coding plasmid pMD2.G (Addgene #12260 and #12259, respectively) using the calcium phosphate method. For production of control nonsilencing lentiviral particles the σ_1R silencing plasmids were substituted with GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control (RHS4346; Thermo Scientific). Infectious lentiviral particles were harvested at 48 h post-transfection, centrifuged 10 min at 3000 rpm to get rid of cell debris, and then filtered through 0.45 μm cellulose acetate filters. The titer of recombinant lentivirus was determined by serial dilution on HEK293T cells. For lentivirus transduction, SK-N-MC cells were subcultured to 50% confluence, cells were transduced with σ_1R-shRNA-expressing len-

tivirus obtained with plasmid V3LHS_377499 (LV sh) or control-shRNA-expressing lentivirus (LV control) at a multiplicity of infection of 10 in the presence of polybrene 5 μg/ml. Virus-containing supernatant was removed after 3 h. Puromycin was added to the culturing media at the final concentration of 1 μg/ml 2 d after infection. Five days after puromycin selection cells were transduced with the second σ_1R-shRNA-expressing lentivirus obtained with plasmid V3LHS_406026 to improve the level of silencing achieved. LV control-infected cells were reinfected with control-shRNA-expressing lentivirus. The second infection was performed as the first one. Cells were tested 72 h after the second transduction was performed.

RNA and real-time PCR. RNA was extracted using TRIzol Reagent (Molecular Research Center). cDNA was synthesized from 2 μg total RNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems). The mRNAs of GAPDH and σ_1R were measured by real-time (RT)-PCR with 1 μL cDNA and power SYBER green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primer sequences are as follows: hGAPDH For: GGCTGGGGCTCATTTGCAGGG, hGAPDH Rev: TGACCTTGGCCAGGG GTGCT, σ_1R For: TTCCAGCGCGAAGAGATAGC, and σ_1R Rev: CCGTGTACTA CCGTCTCCC. Thermal cycling conditions for amplification were set at 50°C for 30 min and 95°C for 10 min, respectively. PCR denaturing was set at 95°C for 15 s and annealing/extending at 60°C for 60 s for 40 cycles. mRNA levels normalized for GAPDH are expressed as fold change relative to control cells. The results were quantified with the comparative C_t method (known as the $2^{-\delta\delta Ct}$ method).

Bioluminescent resonance energy transfer assays. HEK293T cells were transiently cotransfected with a constant amount of cDNA encoding for the receptor fused to Rluc and with increasingly amounts of cDNA corresponding to the receptor fused to YFP (see figure legends). To quantify receptor-YFP expression, fluorescence of cells (20 μg protein) was read in a Fluoro Star Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter at 400 nm reading. For bioluminescent resonance energy transfer (BRET) or BRET with BiLFC measurements, 5 μM coelenterazine H (Invitrogen) was added to the equivalent of 20 μg of cell suspension. After 1 min for BRET or after 5 min for BRET with BiLFC after adding coelenterazine H, the readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. To quantify receptor-Rluc expression, luminescence readings were also performed after 10 min of adding 5 μM coelenterazine H. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] − cf., where cf. corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the donor construct expressed alone in the same experiment. Data were fitted to a nonlinear regression equation, assuming a single phase saturation curve with GraphPad Prism software. BRET is expressed as mili BRET units (mBU; net BRET × 1000).

Sequential resonance energy transfer assays. For sequential resonance energy transfer (SRET) assays, HEK293T cells growing in six-well plates were transiently cotransfected with constant amounts of cDNAs encoding for both receptor fused to Rluc and GFP^2 proteins and with increasing amounts of cDNA corresponding to the receptor fused to YFP protein. In SRET, the oxidation of the Rluc substrate DeepBlueC by receptor-Rluc triggers receptor-GFP^2 excitation (BRET), which triggers a subsequent excitation of receptor-YFP (FRET). Emission of YFP after addition of DeepBlueC is only possible if the three fusion proteins are in close proximity (<10 nm), allowing sequential bioluminescent and fluorescent resonance energy transfer to occur. Cells were used 48 h post-transfection. Using aliquots of transfected cells (20 μg of protein), different determinations were performed in parallel. (1) Quantification of protein-YFP expression was performed as indicated in BRET experiments. (2) For quantification of protein-Rluc expression cells were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom), and luminescence was determined 10 min after addition of 5 μM coelenterazine H in a Mithras LB 940 multimode reader. (3) For SRET, cells were distributed in 96-well microplates (Corning 3600, white plates with white bottom), and 5 μM DeepBlueC (Invitrogen) was added. The SRET signal was collected using a Mithras LB 940 reader with detection filters for short wavelength (410 nm) and long wavelength (530 nm).

Table 1. Cocaine blocks the positive allosteric interaction between D_1R and H_3R.

Competition experiment ([^{3}H]SCH vs SKF38393)	Parameters	
	K_{D1} (nM)	K_{D2} (nM)
Not treated rats in the absence of cocaine		
Control	31 ± 4	1100 ± 200
+RAMH	14 ± 1*	320 ± 10*
Not treated rats in the presence of cocaine		
Control	28 ± 2	1000 ± 100
+RAMH	30 ± 4	1100 ± 200
Cocaine acutely treated rats		
Control	28 ± 4	440 ± 60
+RAMH	19 ± 4	390 ± 40
Sham rats		
Control	26 ± 4	700 ± 100
+RAMH	3 ± 2**	130 ± 40**
Cocaine self-administered rats		
Control	33 ± 6	800 ± 200
+RAMH	37 ± 9	1900 ± 600

Competition curves of the D_1R antagonist [^{3}H]SCH 23390 (2 nM) binding versus increasing concentrations of the D_1R agonist SKF 38393 were performed in the absence or the presence of 2 nM of the H_3R agonist RAMH using striatal membranes from control rats treated or not with 30 μM cocaine for 30 min, rats acutely treated with cocaine, or cocaine self-administered rats. K_{D1} and K_{D2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of SKF 38393 binding to D_1R and were determined by fitting binding data to Equation 3. Parameters are mean ± SEM ($n = 3$). For each group, significant differences with respect to control were calculated by an unpaired Student's t test (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$).

Analogous with BRET, net SRET is defined as [(long wavelength emission)/(short wavelength emission)] − cf., where cf. corresponds to long wavelength emission/short wavelength emission for cells expressing protein-Rluc and protein-GFP^2. Linear unmixing was done for SRET quantification, taking into account the spectral signature to separate the two fluorescence emission spectra (Zimmermann et al., 2002). SRET is expressed as mili SRET units, mSU (net SRET × 1000). Data were fitted as in BRET experiments.

Striatal membrane preparation and coimmunoprecipitation experiments. Mouse or rat striatal tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor cocktail (1/1000; Sigma). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 × g for 5 min at 4°C, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000 × g for 1 h at 4°C. Membranes were washed three more times in the same conditions and were used for ligand binding assays or were solubilized for coimmunoprecipitation experiments with a Dynabeads Protein G kit (Invitrogen) using rat anti-D_1 receptor antibody (1:1000; Sigma). As negative control anti-calnexin antibody (1:1000; BD Biosciences PharMingen) was used. Immunoprecipitates were separated on SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes to perform Western blot assays as previously described (Navarro et al., 2010; Moreno et al., 2011a) using as primary antibodies guinea pig anti-D_1R antibody (1:1000; Frontier Institute), rabbit anti-H_3R antibody (1:1000; Alpha Diagnostic), or mouse anti-σ_1R antibody B-5 (sc-137075) (1:800; Santa Cruz Biotechnology).

In situ *proximity ligation assays.* Mouse or rat striatal slices were mounted on slide glass, thawed at 4°C, washed in 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized with TBS containing 0.01% Triton X-100 for 10 min, and successively washed with TBS. Heteromers were detected using the Duolink II *in situ* PLA detection Kit (OLink Bioscience) following the instructions of the supplier. A mixture of equal amounts of the primary antibodies–guinea pig anti-D_1R antibody (see above) and rabbit anti-H_3R antibody (see above) or mouse anti-σ_1R antibody B-5 (see above) and guinea pig anti-D_1R antibody or mouse anti-σ_1R antibody B-5 and rabbit anti-H_3R antibody–were used to detect D_1R-H_3R, σ_1R-D_1R and σ_1R-H_3R heteromers. respectively. Slices were mounted using the mounting medium with DAPI. The samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems). Images were opened and processed with ImageJ confocal.

Cell signaling. The cAMP concentration was determined by HTRF methodology using the LANCE Ultra cAMP kit (PerkinElmer) and a PHERAstar Flagship Microplate Reader (BMG Labtechnologies) following the instructions of the supplier. To determine ERK 1/2 phosphoryla-

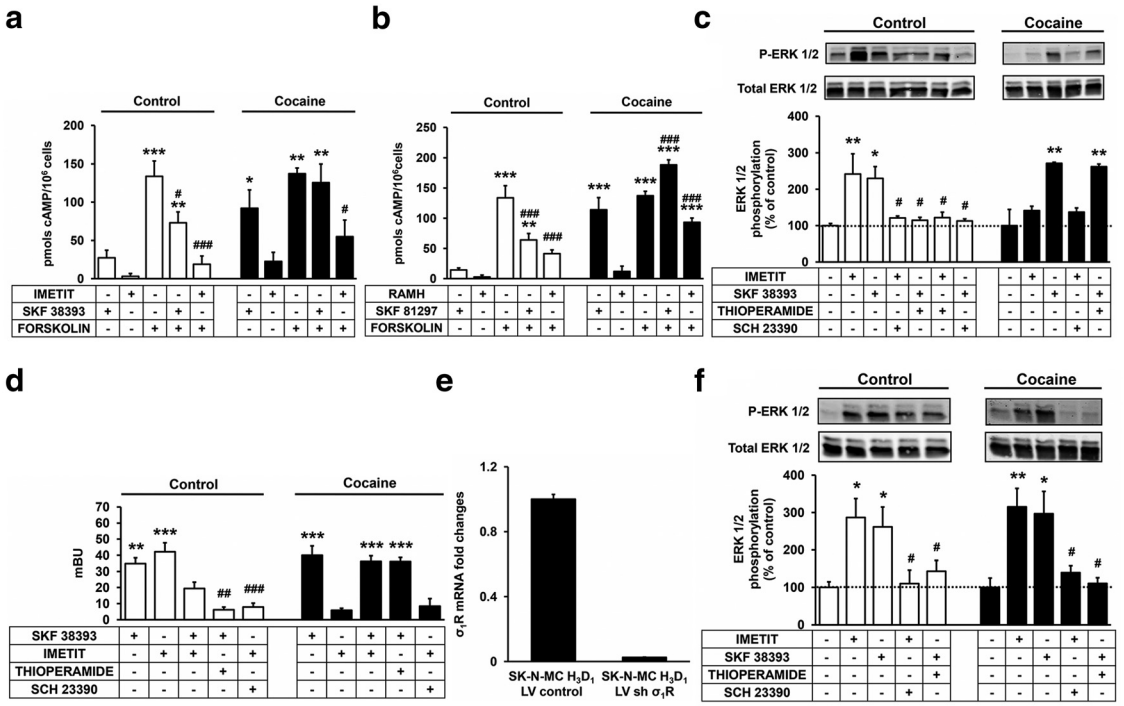


Figure 1. Cocaine alters the functional characteristics of D_1R-H_3R heteromers in transfected cells. ***a–c***, ***f***, Neuroblastoma SK-N-MC cells stable expressing D_1R and H_3R were not treated or treated overnight with 30 μM cocaine. ***a***, ***b***, cAMP production was determined after 10 min stimulation with D_1R agonist SKF 38393 (1 μM) or the H_3R agonist imetit (1 μM) (***a***) or with D_1R agonist SKF 81297 (100 nM) or the H_3R agonist RAMH (100 nM) (***b***) in the absence or in the presence of 0.5 μM forskolin. Values (cAMP produced in each condition minus basal stimulation in the absence of forskolin or agonists) represent mean ± SEM, $n = 4–8$. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test showed a significant ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$) effect over basal (cells not stimulated) or ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$) over forskolin effect (cells stimulated with forskolin). ***c***, ***f***, Cells infected with the empty virus vector (***c***) or infected with lentiviral particles expressing shRNA (shσ_1R) to silence the receptor (***f***) were treated for 30 min with the D_1R antagonist SCH 23390 (1 μM) or the H_3R antagonist thioperamide (1 μM) before the addition of SKF 38393 (100 nM) or imetit (100 nM) for an additional incubation period of 10 min and ERK 1/2 phosphorylation was determined by Western blot. Values represent mean ± SEM ($n = 3–5$) of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated cells. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$) effect over basal or of the antagonist plus agonist treatment over the agonist treatment ($^{\#}p < 0.05$). ***d***, β-Arrestin 1 recruitment was measured by BRET experiments in HEK293T cells 48 h post-transfection with 2 μg of cDNA corresponding to D_1R, 1 μg of cDNA corresponding to β-arrestin 1-Rluc, and 3 μg of cDNA corresponding to H_3R-YFP. Cells were not treated (BRET < 10) or treated for 30 min with 30 μM cocaine, 1 μM SCH 23390, or 1 μM thioperamide alone or in combination before 10 min stimulation with SKF 38393 (100 nM) or imetit (100 nM). Values represent mean ± SEM, $n = 4$. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant effect over basal ($^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$) or of the antagonist plus agonist treatment over the agonist treatment ($^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$). ***e***, σ_1R expression was determined after silencing of σ_1R by shRNA. Neuroblastoma SK-N-MC cells stable expressing D_1R and H_3R were infected with lentiviral particles containing either control (LV control) or shRNA specific for σ_1R (LV sh σ_1R) and the relative expression levels were tested using quantitative RT-PCR. Results are expressed as an average of three replicates.

tion, cells and mouse or rat striatal slices were treated or not with the indicated ligand for the indicated time and were lysed by the addition of 500 μl of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 μM phenylarsine oxide, 0.4 mM $NaVO_4$, and protease inhibitor cocktail). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 × *g* for 5 min at 4°C and the protein was quantified by the bicinchoninic acid method using BSA dilutions as standard. ERK1/2 phosphorylation were then detected as described previously (Moreno et al., 2011a). Arrestin recruitment was determined by BRET experiments (see above) in HEK293T cells 48 h after transfection with the indicated amounts of cDNA corresponding to D_1R, β-arrestin 1-Rluc, and H_3R-YFP. Cells (20 μg of cell suspension protein per well in a 96-well microplates) were not treated or treated for 30 min with 30 μM cocaine or 1 μM of the antagonists SCH 23390 or thioperamide alone or in combination, and 5 μM coelenterazine H was added before stimulation with the agonists SKF 38393 (100 nM) or imetit (100 nM) for 12 min and BRET between β-arrestin 1-Rluc and H_3R-YFP was determined as above.

Radioligand binding experiments and binding data analysis. Ligand binding was performed with rat striatal membranes (0.2 mg of protein/ml) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM $MgCl_2$, at 25°C. For competition experiments, membranes were incubated with free 2 nM [^{3}H]SCH 23390 (PerkinElmer) or free 3 nM [^{3}H]R-a-methyl histamine ([^{3}H]RAMH; GE Healthcare) or free 2 nM [^{3}H] YM-09151-02 (PerkinElmer) in the presence or the absence of increasing free concentrations of SKF 38393 (0.01 nM–30 μM; Tocris Bioscience) with or without 2 nM RAMH (Sigma), increasing free concentrations of SCH 23390 (0.01 nM–10 μM; Sigma), increasing free concentrations of RAMH (0.01 nM–30 μM), or increasing free concentrations of PRE-084 (0.01 nM to 10 μM; Tocris Bioscience). In all cases, membranes were incubated with ligands providing enough time to achieve stable equilibrium for the lower ligand concentrations. Nonspecific binding was determined in the presence of 30 μM nonlabeled ligand and confirmed that the value was the same as calculated by extrapolation of the competition curves. Free and membrane bound ligands were separated by rapid filtration of 500 μl aliquots in a cell harvester (Brandel) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% PEI that were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer. The filters were incubated overnight with 10 ml of Ecoscint H scintillation mixture (National Diagnostics) at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (PerkinElmer) with an efficiency of 62%. Protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical) using BSA dilutions as standard.

Competition curves were analyzed by nonlinear regression, using the commercial GraFit software (Erithacus software), by fitting the binding data to the two-state dimer receptor model (Franco et al., 2005, 2006) To calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants Equation 1 deduced by Casadó et al. (2007) was used.

$$A_{bound} = (K_{DA2}A + 2A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB})R_T\ (K_{DA1}K_{DA2}$$

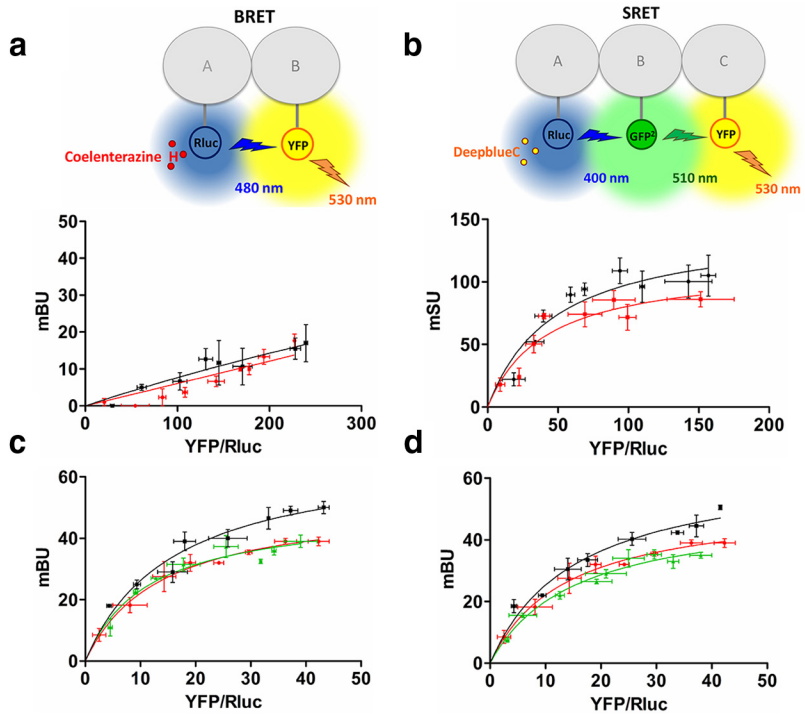


Figure 2. σ_1R-D_1R-H_3R complexes detected by energy transfer experiments. ***a***, ***c***, ***d***, BRET saturation experiments were performed using HEK293T cells 48 h post-transfection with 0.2 μg of cDNA corresponding to H_3R-Rluc (***a***) or 0.15 μg of cDNA corresponding to D_1R-Rluc (***c***, ***d***) and increasing amounts of cDNA corresponding to σ_1R-YFP (***a***; 0.1–0.5 μg cDNA) or H_3R-YFP (***c***, ***d***; 0.2–1.5 μg cDNA). Cells were treated for 30 min (***a***, ***c***) or 24 h (***d***) with medium (red lines) or with 30 μM cocaine (black lines) prior BRET determination. ***c***, ***d***, Cells were also transfected with siRNA for σ_1R (see Materials and Methods; green line). Both fluorescence and luminescence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (~110,000 bioluminescence units) while monitoring the increase in acceptor expression (10,000–40,000 fluorescence units). ***b***, SRET saturation experiments were performed using HEK293T cells 48 h post-transfection with 0.3 μg of cDNA corresponding to H_3R-Rluc, 0.23 μg of cDNA corresponding to σ_1R-GFP^2, and increasing amounts of cDNA corresponding to D_1R-YFP (0.05–0.6 μg). Cells were treated for 30 min with medium (red lines) or with 30 μM cocaine (black lines) prior to SRET determination. The relative amount of BRET or SRET is given as a function of 100 × the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc). BRET and SRET are expressed as mBU or mSU, respectively, and values are means ± SEM; three to four different experiments grouped as a function of the amount of acceptor. ***a***, ***b***, Top, A schematic representation of the BRET (***a***) and SRET (***b***) techniques is shown.

$$+ K_{DA2}A + A^2 + K_{DA2}AB/K_{DAB} + K_{DA1}K_{DA2}B/K_{DB1} + K_{DA1}K_{DA2}B_2/(K_{DB1}K_{DB2})), \quad (1)$$

where A represents the radioligand concentration, R_T is the total amount of receptor dimers, and K_{DA1} and K_{DA2} are the macroscopic dissociation constants describing the binding of the first and the second radioligand molecule (A) to the dimeric receptor; B represents the assayed competing compound concentration, and K_{DB1} and K_{DB2} are, respectively, the equilibrium dissociation constants of the first and second binding of B. K_{DAB} can be described as a hybrid equilibrium radioligand/competitor dissociation constant, which is the dissociation constant of B binding to a receptor dimer semi-occupied by A.

To quantify cooperativity, the dimer cooperativity index for the competing ligand B is defined by Casadó et al. (2007) as follows:

$$D_{CB} = \log (4K_{DB1}/K_{DB2}). \quad (2)$$

Depending on the characteristics of the ligands (the radioligand A and the competitor B) the following simplifications of the Equation 1 were considered:

For A ([^{3}H]SCH 23390) noncooperative and B (SKF 38393) cooperative (biphasic competition curves; Table 1): Equation 1 can be simplified to Equation 3 due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$ and, therefore, K_{DA1} is enough to characterize the binding of the radioligand A (Casadó et al., 2007):

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

For A ([^{3}H] YM-09151–02) and B (B_{max} determination for σ_1R in Fig. 7): Equation 1 was simplified to Equation 4 due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$ and $K_{DB2} = 4K_{DB1}$ (Casadó et al., 2007):

$$A_{bound} = (4K_{DA1}A + 2A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB})R_T/(4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + 4K_{DA1}AB/K_{DAB} + 4K_{DA1}^2B/K_{DB1} + 4K_{DA1}^2B^2/K_{DB1}^2). \quad (4)$$

For A ([^{3}H]SCH 23390 or [^{3}H]RAMH) and B (SCH 23390 or RAMH) noncooperative being the A and B the same compound (B_{max} determination for D_1R or H_3R in Fig. 7): Equation 1 was simplified to Equation 5 due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$, $K_{DB2} = 4K_{DB1}$, $K_{DA1} = K_{DB1}$, $K_{DA2} = K_{DB2}$ and $K_{DAB} = 4K_{DA1}$ (Casadó et al., 2007):

$$A_{bound} = (4K_{DA1}A + 2A^2AB)R_T/(4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1}A + A^2 + AB + 4K_{DA1}B + B_2). \quad (5)$$

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

Results

D_1R-H_3R heteromers are signaling units that can be modulated by cocaine

It has previously been described that the formation of D_1R-H_3R heteromers in neuroblastoma cells leads to a change in the D_1R G-protein coupling from the G_s to the G_i protein, to which H_3R is coupled. In fact, in the presence of the H_3R, D_1R was no longer coupled to G_s, and could not activate adenylyl cyclase, yet the heteromer remains coupled to G_i (Ferrada et al., 2009). This change in G-protein coupling was identified as a specific characteristic of the heteromer. We first examined whether cocaine is able to influence the G-protein coupling to D_1R-H_3R heteromers by measuring cAMP production, which is tied to the activation of G-proteins. In SK-N-MC neuroblastoma cells expressing D_1R and H_3R, the D_1R agonist SKF 38393 was able to reduce the forskolin-stimulated cAMP production in accordance with a G_i protein coupling (Fig. 1*a*). Interestingly, in the presence of 30 μM cocaine, SKF 38393 increases cAMP production and did not affect forskolin-induced cAMP, in agreement with a G_s coupling (Fig. 1*a*). In contrast with D_1R agonist, the H_3R agonist imetit induced a decrease in cAMP production in the presence or in the absence of cocaine in accordance with a G_i-protein coupling (Fig. 1*a*). Similar results were obtained using the H_3R agonist RAMH and the D_1R agonist SKF 81297 (Fig. 1*b*). These data suggest that cocaine may alter the G-proteins associated with the heteromer or at a minimum alter D_1R-H_3R signaling. Next, we examined whether cocaine could

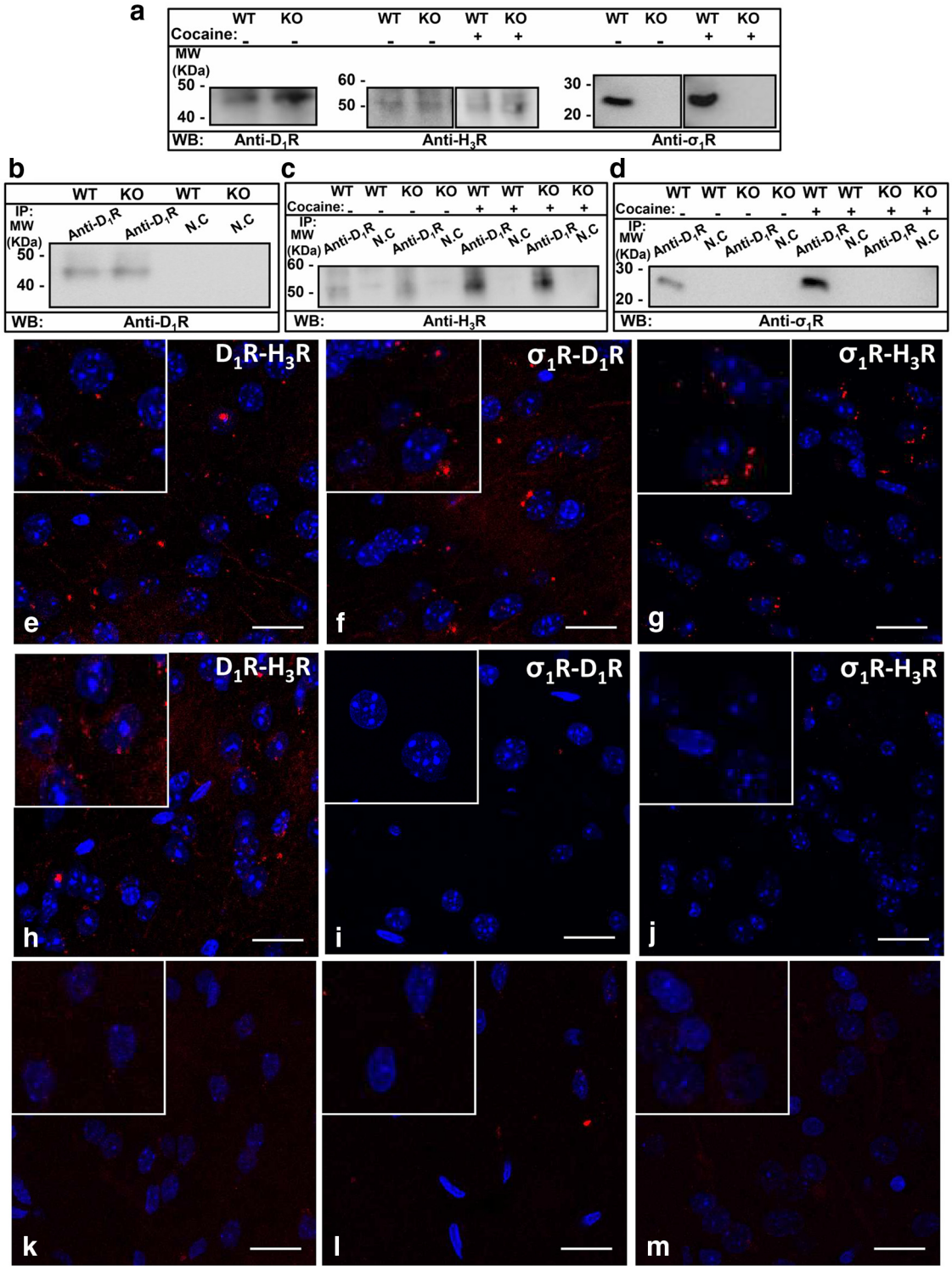


Figure 3. Expression of σ_1R-D_1R-H_3R complexes in the mouse striatum detected by coimmunoprecipitation and PLA experiments. ***a–d***, Coimmunoprecipitation experiments are shown. Striatal slices from WT and σ_1R KO mice were untreated or treated with 150 μM cocaine for 30 min (cocaine). Solubilized striatal membranes (***a***) and immunoprecipitates with anti-D_1R antibody or anti-calnexin antibody as negative control (NC; ***b–d***) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-D_1R antibody (***b***), anti-H_3R antibody (***c***), or anti-σ_1R antibody (***c***). IP, immunoprecipitation; WB, Western blotting; MW, molecular mass. ***e–m***, PLAs were performed as indicated in Materials and Methods, using WT (***e–g***) or σ_1R KO mice (***h–j***) striatal slices. D_1R-H_3R (***e***, ***h***), σ_1R-D_1R (***f***, ***i***), and σ_1R-H_3R (***g***, ***j***) heteromers were visualized as red spots around blue-colored DAPI-stained nucleus. ***k–m***, Negative controls were performed doing the PLA experiments in WT mouse striatal slices incubated with only anti D_1R (***k***), anti-σ_1R (***l***), or anti-H_3R (***m***) antibody as primary antibodies. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). For each part a magnification is shown. Scale bar, 20 μm.

disrupt the cross-antagonism between both receptors in the heteromer previously described (Moreno et al., 2011a). In SK-N-MC neuroblastoma cells expressing D_1R and H_3R, the D_1R agonist SKF 38393 induced ERK 1/2 phosphorylation that was similar in the absence or the presence of cocaine suggesting that this signal was G-protein independent. SKF 38393-induced ERK 1/2 phosphorylation was blocked by its own antagonist SCH 23390 as well as by the H_3R antagonist thioperamide, but this

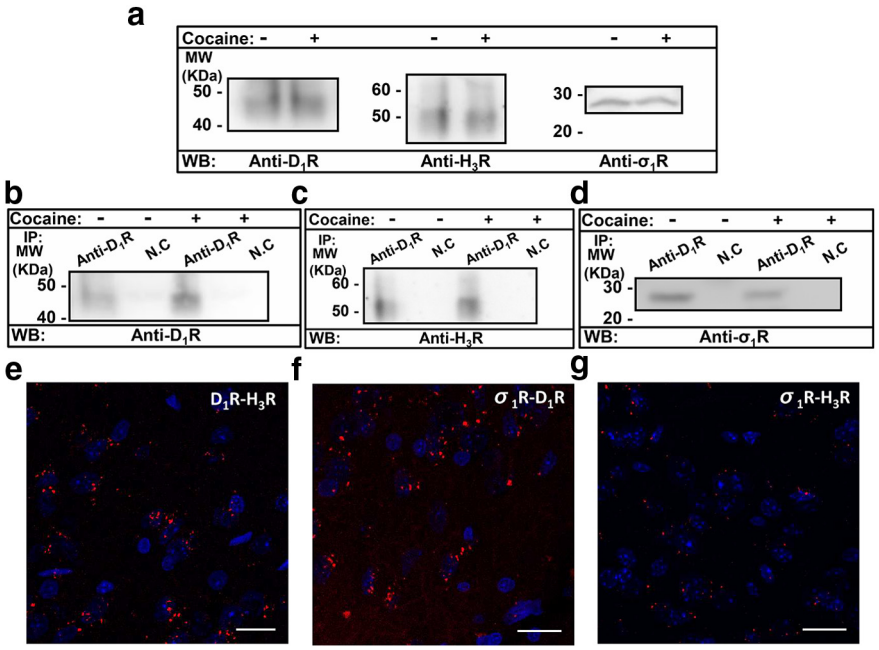


Figure 4. Expression of σ_1R-D_1R-H_3R complexes in the rat striatum detected by coimmunoprecipitation and PLA experiments. ***a–d***, Coimmunoprecipitation experiments are shown. Rat striatal slices were untreated or treated with 150 μM cocaine for 30 min (cocaine). Solubilized striatal membranes (***a***) and immunoprecipitates with anti-D_1R antibody or anti-calnexin antibody as negative control (NC; ***b–d***) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-D_1R antibody (***b***), anti-H_3R antibody (***c***), or anti-σ_1R antibody (***c***). IP, immunoprecipitation; WB, Western blotting; MW, molecular mass. ***e–g***, PLAs were performed as indicated in Materials and Methods, using rat striatal slices. D_1R-H_3R (***e***), σ_1R-D_1R (***f***), and σ_1R-H_3R (***g***) heteromers were visualized as red spots around blue– colored DAPI-stained nucleus. Scale bar, 20 μm.

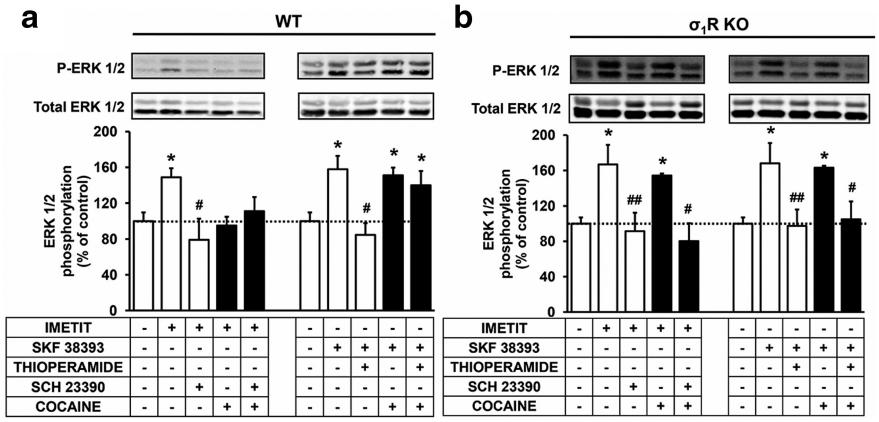


Figure 5. Cocaine inhibits the H_3R signaling and the D_1R-H_3R cross-antagonism in ERK 1/2 phosphorylation in mouse striatum. WT (***a***) and σ_1R KO (***b***) mouse striatal slices were treated or not with 150 μM cocaine for 2 h and were preincubated for 20 min with medium, the D_1R antagonist SCH 23390 (10 μM), or the H_3R antagonist thioperamide (10 μM) before the addition of the D_1R agonist SKF 38393 (1 μM) or the H_3R agonist imetit (1 μM) for an additional incubation period of 10 min. ERK 1/2 phosphorylation was determined by Western blot. Immunoreactive bands from three to eight slices obtained from eight WT or KO animals were quantified for each condition. Values represent mean ± SEM percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. No significant differences were obtained between the basal levels of the WT and the σ_1R KO mice. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant ($^*p < 0.05$) effect over basal or of the antagonist plus agonist treatment over the agonist treatment ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$).

cross-antagonism was not seen in cells treated with 30 μM cocaine (Fig. 1*c*). Analogously, the H_3R agonist imetit-induced ERK 1/2 phosphorylation was reverted by both thioperamide and the D_1R antagonist SCH 23390. Again, the cross-antagonism was lost in the presence of cocaine and, in these conditions, the signaling induced by imetit was very low (Fig. 1*c*) in agreement with the requirement of D_1R-H_3R heteromers for imetit to signal via the ERK 1/2 pathway (Moreno et al., 2011a).

Apart from G-protein-mediated signaling, many GPCRs are able to signal by an arrestin recruitment-dependent mechanism with p-ERK 1/2 being one of the signaling pathways downstream of arrestin (Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy et al., 2006; DeWire et al., 2007). If cocaine is able to alter the D_1R-H_3R heteromer-driven activation of ERK 1/2 then one possibility is that it also alters arrestin recruitment. Using BRET to measure β-arrestin 1 recruitment we investigated if cocaine is able to modulate the ligand-induced β-arrestin 1 recruitment to these receptors. In HEK293 cells transiently expressing D_1R, β-arrestin 1-Rluc, and H_3R-YFP, a positive BRET signal between β-arrestin 1 and H_3R was detected after stimulation with H_3R agonist imetit or with D_1R agonist SKF 38393 (Fig. 1*d*). Interestingly, the BRET signal was diminished when cells were coactivated with both agonists, indicating a negative cross-talk between both receptors and in line with that seen in neurons (Arias-Montaño et al., 2001). In addition, we could also detect cross-antagonism in the β-arrestin 1 recruitment assays, that is, the BRET induced by SKF 38393 was blocked by the H_3R antagonist thioperamide and the BRET induced by imetit was blocked by the D_1R antagonist SCH 23390 (Fig. 1*d*). These results match what was seen with the p-ERK 1/2, suggesting that the earlier signaling changes may be due to changes in β-arrestin 1 recruitment. This negative cross-talk and cross-antagonism at the level of β-arrestin 1 recruitment were not observed in cells treated with 30 μM cocaine (Fig. 1*d*), supporting the hypothesis that cocaine can alter the function of D_1R-H_3R heteromers. In the presence of cocaine, the imetit-induced β-arrestin 1 recruitment was very low (Fig. 1*d*) indicating the need for functional D_1R-H_3R heteromers for imetit to induce arrestin recruitment as well as ERK 1/2 signaling.

We and others have shown that one of the targets of cocaine is the chaperone-like protein, σ_1R, which can interact with and modulate D_1R (Hiranita et al., 2010, 2013; Navarro et al., 2010; Katz et al., 2011; Kourrich et al., 2012, 2013). From these studies it is tempting to hypothesize that σ_1R can mediate cocaine's effect by molecularly interacting with D_1R-H_3R heteromers. To test this, we first repeated the signaling in neuroblastoma cells using cells in which σ_1R was silenced by shRNA infection (Fig. 1*e*). In these cells, cocaine did not affect the cross-antagonism or the imetit-induced signaling (Fig. 1*f*), demonstrating that σ_1R are indeed mediating cocaine's effects on D_1R-H_3R signaling. These results show that σ_1R is required for cocaine's effects but does not demonstrate a molecular interac-

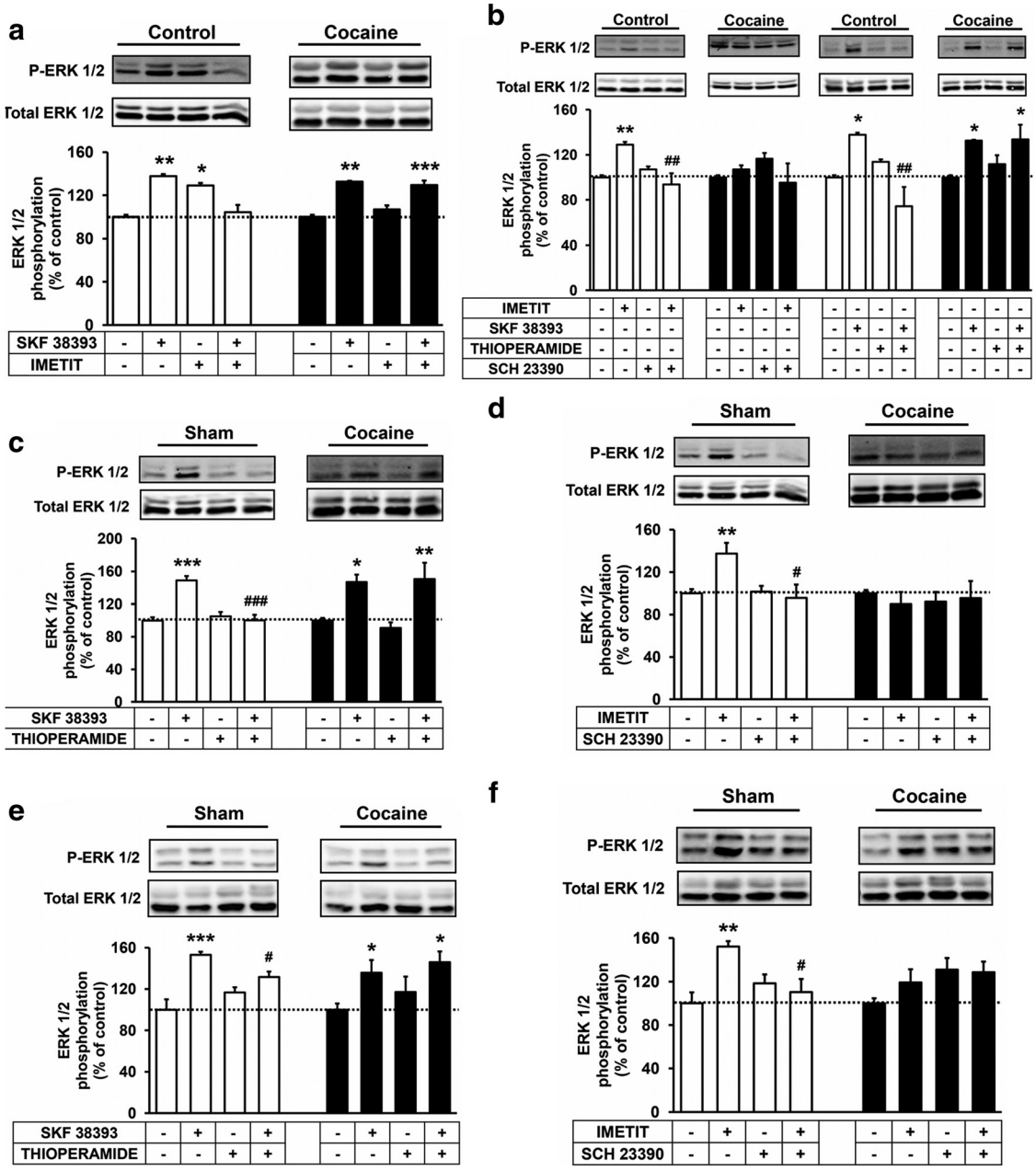


Figure 6. Cocaine inhibits the H_3R-mediated modulation of D_1R-promoted ERK 1/2 phosphorylation in rat striatum. Striatal slices from naive rats treated or not with 150 μM cocaine for 2 h (***a***, ***b***) and striatal slices from sham rats or rats acutely treated (24 h) with cocaine (***c***, ***d***), or striatal slices from sham rats or 9 weeks cocaine self-administered rats (***e***, ***f***) were preincubated for 20 min with medium, the D_1R antagonist SCH 23390 (10 μM), or the H_3R antagonist thioperamide (10 μM) before the addition of the D_1R agonist SKF 38393 (1 μM) or the H_3R agonist imetit (1 μM) for an additional incubation period of 10 min and ERK 1/2 phosphorylation was determined by Western blot. Immunoreactive bands from 3 to 10 slices obtained from four animals were quantified for each condition. Values represent mean ± SEM percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant ($^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$) effect over basal or of the antagonist plus agonist treatment over the agonist treatment ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$).

tion between σ_1R and D_1R-H_3R heteromers. To test first if σ_1R can directly interact with H_3R we performed BRET experiments in HEK293T cells expressing a constant amount of H_3R-Rluc and increasing amounts of σ_1R-YFP. As shown in Figure 2*a*, we did not detect energy transfer in these cells nor in cells treated with 30 μM cocaine for 30 min, suggesting a lack of interaction between H_3R and σ_1R. Next we used SRET (Carriba et al., 2008) to study if H_3R and σ_1R can interact in the presence of D_1R. For this, Rluc was fused to H_3R to act as a BRET donor, GFP^2 was fused to D_1R to act as a BRET acceptor and as a FRET donor, and YFP was fused to σ_1R to act as a FRET acceptor (Fig. 2*b*). In HEK293T cells expressing a constant amount of H_3R-Rluc and D_1R-GFP^2 and increasing amounts of σ_1R-YFP, a positive SRET saturation curve was obtained (Fig, 2*b*, red curve) with a $SRET_{max}$ of 114 ± 18 mSU and $SRET_{50}$ of 41 ± 18. These results indicate that σ_1Rs can complex with D_1R-H_3R heteromers through an interaction with D_1R in the heteromer. As cocaine can bind σ_1R at pharmacological relevant concentrations (Matsumoto et al., 2003; Hayashi and Su, 2005; Hiranita et al., 2010, 2013; Kourrich et al., 2012) we next wanted to examine whether cocaine is able to modulate the D_1R-H_3R heteromer at the molecular level via σ_1R. When the SRET experiments described above were performed in cells treated 30 min with 30 μM cocaine (Fig. 2*b*, black curve), a positive SRET saturation curve was obtained with a slight increase in

the maximum energy transfer ($SRET_{max}$ = 145 ± 19 mBU and $SRET_{50}$ = 48 ± 17), suggesting that cocaine binding changes the quaternary structure of the heteromer decreasing the distance or favoring the orientation between the donor and acceptor proteins. The cocaine-induced structural changes were also observed in BRET saturation curves for the D_1R-Rluc-H_3R-YFP pair in cells expressing a constant amount of D_1R-Rluc and increasing amounts of H_3R-YFP where there was an increase in energy transfer after cells were treated with 30 μM cocaine for 30 min (Fig. 2*c*, red curve; $BRET_{max}$ = 52 ± 2 mBU and $BRET_{50}$ = 14 ± 2 vs black curve, $BRET_{max}$ = 68 ± 6 mBU and $BRET_{50}$ = 16 ± 4). This effect was reverted in cells whose endogenous σ_1R expression was silenced using siRNA previously described (Navarro et al., 2010; Fig. 2*c*, green curve; $BRET_{max}$ = 49 ± 4 mBU and $BRET_{50}$ = 11 ± 3). Similar results were obtained in cells treated with 30 μM cocaine for 24 h (Fig. 2*d*). These results suggest that cocaine binding to σ_1R is not disrupting D_1R-H_3R heteromers, but is inducing structural changes in D_1R-H_3R heteromers. Thus, it is clear that in transfected cells cocaine, by binding to σ_1R, alters the D_1R-H_3R heteromer such that it can diminish H_3R receptor ability to modify D_1R signaling.

The σ_1R mediates cocaine's effects on D_1R-H_3R heteromer function in the striatum

Although the σ_1R-mediated ability of cocaine to modulate the structure and signaling of D_1R-H_3R heteromers in cells is suggestive of a novel cocaine mechanism, it is important to show that similar events can occur in tissue. First we tested whether σ_1R-D_1R-H_3R complexes are expressed in WT and σ_1R KO mice striatum by coimmunoprecipitation experiments and by proximity ligation assays (PLA) using specific antibodies we described previously (Moreno et al., 2011a; Navarro et al., 2013). By Western blot experiments we found the expression of both D_1R and H_3R in the striatum of WT and KO mice and the expression of σ_1R receptors in WT but not in the striatum of σ_1R KO mice (Fig. 3*a*). In coimmunoprecipitation experiments (Fig. 3*b–d*) the antibody against D_1R could indeed coprecipitate D_1R (Fig. 3*b*) and H_3R (Fig. 3*c*) in WT or KO mice striatal membranes, and this antibody also coimmunoprecipitates σ_1R from WT striatum but not from KO striatum (Fig. 3*d*). It is interesting to note that the D_1R-H_3R or D1R-σ_1R coimmunoprecipitation increased after treatment with 30 μM cocaine (Fig. 3*c* and *d*). This could be due to a cocaine-induced higher σ_1R expression at the membrane (Hayashi and Su, 2005; Navarro et al., 2010) where heterocomplex formation might be favored. The coimmunoprecipitation results are in line with the BRET experiments above and highly suggestive that σ_1R-D_1R-H_3R complexes are expressed in the striatum of WT animals and that D_1R-H_3R heteromer expression is maintained in the striatum of σ_1R KO mice. Interestingly, the coprecipitation of H_3R by anti-D_1R is more efficient in the presence of cocaine, suggesting a change in the strength of interaction, consistent with the increase in the SRET detected in Figure 2*b*. Furthermore we used the PLA to explore whether D_1R-H_3R heteromer expression was maintained in σ_1R KO mice and whether σ_1R-D_1R-H_3R complexes could be detected in WT mice. PLA requires that both receptors be close enough to allow the two different antibody-DNA probes to be able to ligate (<17 nm; Söderberg et al., 2008; Trifilieff et al., 2011). If the receptors are within sufficient proximity, a punctate fluorescent signal can be detected by confocal microscopy. Using striatal slices from both WT (Fig. 3*e–g*) and σ_1R KO (Fig. 3*h–j*), a red punctate fluorescent stain surrounding DAPI-positive nuclei was observed for the H_3R-D_1R (Fig. 3*e*), D_1R-σ_1R (Fig. 3*f*), or H_3R-σ_1R (Fig. 3*g*) pairs

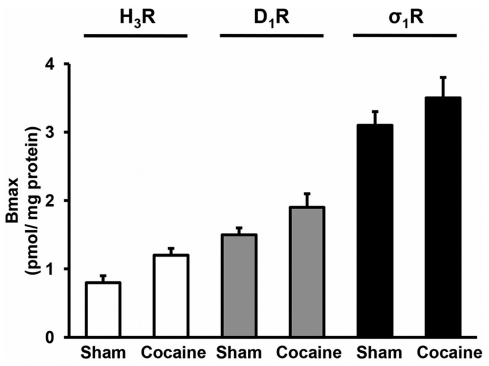


Figure 7. Receptor expression in the striatum of cocaine acutely treated rats compared with sham rats. The expression of H_3R (white bars), D_1R (gray bars), and σ_1R (black bars) in striatal membranes from a pool (n = 5) of sham rats or rats acutely treated (24 h) with cocaine (cocaine) was determined by competition experiments of [^{3}H]RAMH (3 nM) versus RAMH, [^{3}H]SCH 23390 (2 nM) versus SCH 23390, or [^{3}H] YM-09151-02 (2 nM) versus PRE-084, respectively. Competition curves were monophasic and binding data were fitted to Equations 4 or 5 (see Materials and Methods) to calculate the maximum binding.

in WT mouse striatum but only H_3R-D_1R heteromers were detected in σ_1R KO animals (Fig. 3*h*). These data confirm the coprecipitation experiments above. As a negative control we checked that the red spots were not seen in slices treated with only one primary antibody and both secondary antibody-DNA probes (Fig. 3 *k–m*). To determine the cocaine effect on the striatal D_1R-H_3R heteromerization we performed PLA experiments in the presence of cocaine. In these conditions, results from PLA experiments were very similar to the ones obtained in the absence of cocaine (results not shown), indicating that σ_1R, D_1R, and H_3R are indeed in a complex in mice striatum in the presence or absence of cocaine. Next, by using the coimmunoprecipitation and PLA experiments described above, we observed that σ_1R-D_1R-H_3R complexes are expressed in the rat striatum since the antibody against D_1R could indeed coprecipitate D_1R, H_3R, and σ_1R in the absence or the presence of cocaine and we detected red spots in the PLA experiments for the pairs H_3R-D_1R, D_1R-σ_1R, or H_3R-σ_1R (Fig. 4). These results suggest that σ_1R-D_1R-H_3R complexes are expressed in rat striatum and that cocaine, by binding to σ_1R, does not disrupt the heteromer per se.

To test the cocaine effect on H_3R-D_1R heteromer signaling in the striatum we determined the receptor agonists induced ERK 1/2 phosphorylation using striatal slices. To test if cocaine effect is mediated by σ_1R we performed the signaling experiments in WT and σ_1R KO mice. If cocaine is indeed acting via σ_1R to modify the D_1R-H_3R heteromer in the striatum, then we should see no effect of cocaine in the σ_1R KO mice. The striatal level of cocaine reached after pharmacologically significant doses is 15 μM (Pettit et al., 1990). To allow diffusion into the tissue in brain slices we used a 10-fold higher cocaine concentration, 150 μM. We determined the cross-antagonism in ERK 1/2 phosphorylation using striatal slices from WT and σ_1R KO mice in the absence or the presence of cocaine. In the absence of cocaine the ERK 1/2 phosphorylation induced by the D_1R agonist SKF 38393 was reverted by the H_3R antagonist thioperamide in striatal slices from WT (Fig. 5*a*) and from σ_1R KO mice (Fig. 5*b*). These data indicate that functional D_1R-H_3R heteromers are expressed in the striatum of both WT and σ_1R KO mice in agreement to the PLA results above. In addition, the presence of cocaine did not affect H_3R signaling and the cross-antagonism in striatal slices from σ_1R KO mice (Fig. 5*b*). In contrast, cocaine blocked the H_3R signaling and the D_1R-H_3R cross-antagonism in slices from

WT mice (Fig. 5*a*). These results indicate that cocaine binding to σ_1R blocks the H_3R-mediated modulation of D_1R signaling in the striatum.

Short or long treatment with cocaine disrupts the allosteric interaction between D_1R and H_3R in the striatum

One of the striking effects of cocaine is its ability to show prolonged effects even after a single exposure. We next wanted to examine whether and how D_1R-H_3R heteromer function might change in acute versus prolonged exposure to cocaine. For this we used a rat model of self-administration and compared the results to acute treatment. First, we confirmed that the effect of cocaine on the heteromer signaling in *ex vivo* rat striatal slices was equivalent to that of those in mice striatal slices seen above. In the absence of cocaine, the activation of slices with the D_1R agonist SKF 38393 or the H_3R agonist imetit induced ERK 1/2 phosphorylation, in line with the results found in mice. In addition, the coactivation with both agonists inhibited this signaling (Fig. 6*a*) indicating a negative cross-talk between both receptors. Importantly, when slices were treated with 150 μM cocaine, imetit was not able to induce ERK 1/2 phosphorylation and the negative cross-talk was not observed (Fig. 6*a*). The ERK 1/2 phosphorylation induced by the D_1R agonist SKF 38393 or the H_3R agonist imetit was blocked by both the H_3R antagonist thioperamide and the D_1R antagonist SCH 23390 (Fig. 6*b*). This cross-antagonism was not observed when slices were treated with 150 μM cocaine again matching the results found in mice.

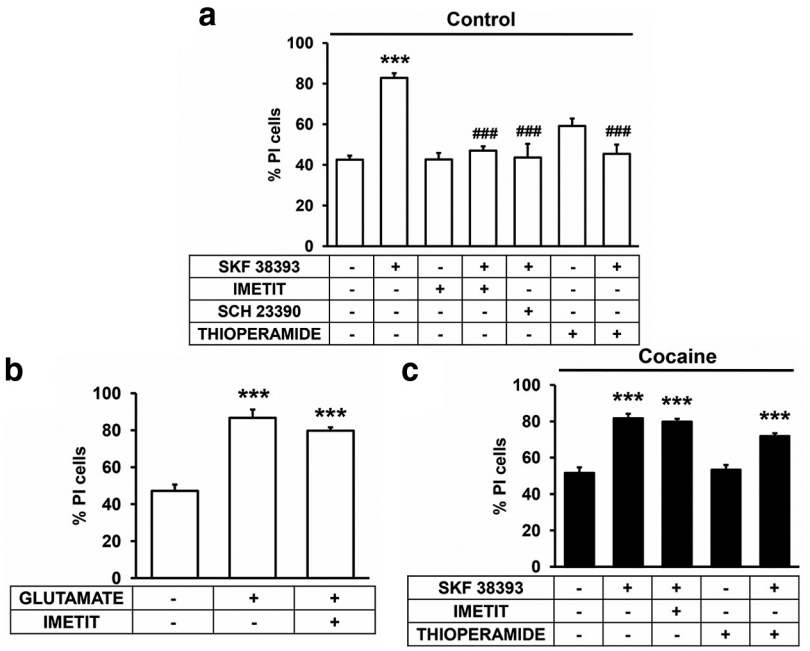


Figure 8. Cocaine inhibits the H_3R-mediated modulation of D_1R-promoted cell death in organotypic striatal slice cultures. Organotypic cultures of rat striatal slices were prepared as indicated (see Materials and Methods) and after 24 h, culture medium was replaced by fresh medium containing no ligands (***a***) or 150 μM cocaine (***c***). After 1 h, vehicle or 10 μM SCH 23390, imetit, or thioperamide were added and incubated for an additional 1 h before the addition of the D_1R agonist SKF 38393 (50 μM) and slices were maintained 48 h more in culture. As a control, cell death induced by 1 mM glutamate in the presence or in the absence of 10 μM imetit was analyzed (***b***). Cell death was determined by DAPI and PI staining as indicated (see Materials and Methods). Values represent mean ± SEM percentage of PI stained cells versus total DAPI-stained cells determined in six to eight fields from two to three independent organotypic cultures. Bifactorial ANOVA showed a significant ($^{***}p < 0.001$) effect over basal corresponding to nontreated organotypic cultures. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant ($^{***}p < 0.001$) effect over basal corresponding to nontreated organotypic cultures or of organotypic cultures treated with two ligands respect to the cultures treated with SKF 38393 ($^{###}p < 0.001$).

Next we examined whether a single exposure *in vivo* to cocaine could influence the function of D_1R-H_3R heteromers. Using rats acutely injected with one dose of cocaine, we analyzed the ability of H_3R to influence D_1R-induced ERK 1/2 phosphorylation using striatal slices 24 h after injection. Unlike the sham rats, in the cocaine-treated rats the ERK 1/2 phosphorylation induced by the D_1R agonist SKF 38393 was not reverted by the H_3R antagonist thioperamide (Fig. 6*c*). The ERK 1/2 phosphorylation induced by the H_3R agonist imetit was reverted by the D_1R antagonist SCH 23390 in the sham rats, but imetit was not able to signal in cocaine-treated rats (Fig. 6*d*), suggesting that 24 h after cocaine treatment the heteromer is not functional or disrupted, an effect not due to changes in the receptor expression by cocaine treatment (Fig. 7). Next, we wanted to test whether the molecular changes observed in the presence of cocaine were short term or whether they might persist in models of long-term addiction. To explore this we tested the effects of cocaine in long-term cocaine self-administered rats using striatal slices obtained 1 d after the last session of rats exposed to a cocaine self-administration regime of 6–11 weeks. Comparing signaling in striatal slices from rats with cocaine self-administration and sham rats we again observed a reduced cross-antagonism in the cocaine-treated animals (Fig. 6*e*,*f*). Together, it is clear that short and long cocaine treatment allows D_1R to signal freely by hindering the dampening effect that H_3R normally provides in the brain striatum.

One of the mechanisms by which heteromers function is through the direct modulation of the ligand affinity of the partner receptor (González et al., 2012). We sought to test this property for rat striatal D_1R-H_3R heteromers and whether cocaine could modulate it. We performed radioligand binding experiments using striatal membranes obtained 1 d after the last session of rats exposed to cocaine self-administration for 6–11 weeks, rats acutely treated with one dose of cocaine, or sham rats and we compared the results with the ones obtained with naive rat striatal membranes exogenously treated with 30 μM cocaine for 30 min. Competition curves of D_1R antagonist [^{3}H]SCH 23390 binding versus increasing concentrations of D_1R agonist SKF 38393 in the absence or the presence of the H_3R agonist RAMH were performed as indicated (see Materials and Methods). In all cases the competition curves were biphasic and binding data were fitted to the two-state dimer receptor model (see Materials and Methods) to calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants using the equations described (see Materials and Methods). The values appear in Table 1. In striatal membranes from naive rats not treated with cocaine or from sham rats, the H_3R agonist induced a decrease of the D_1R macroscopic equilibrium dissociation constant values, indicating an allosteric interaction between both receptors. However, treating the striatal membranes from naive rats with cocaine or using striatal membranes from cocaine self-administered rats or from rats acutely treated with cocaine, this allosteric interaction was not observed (Table

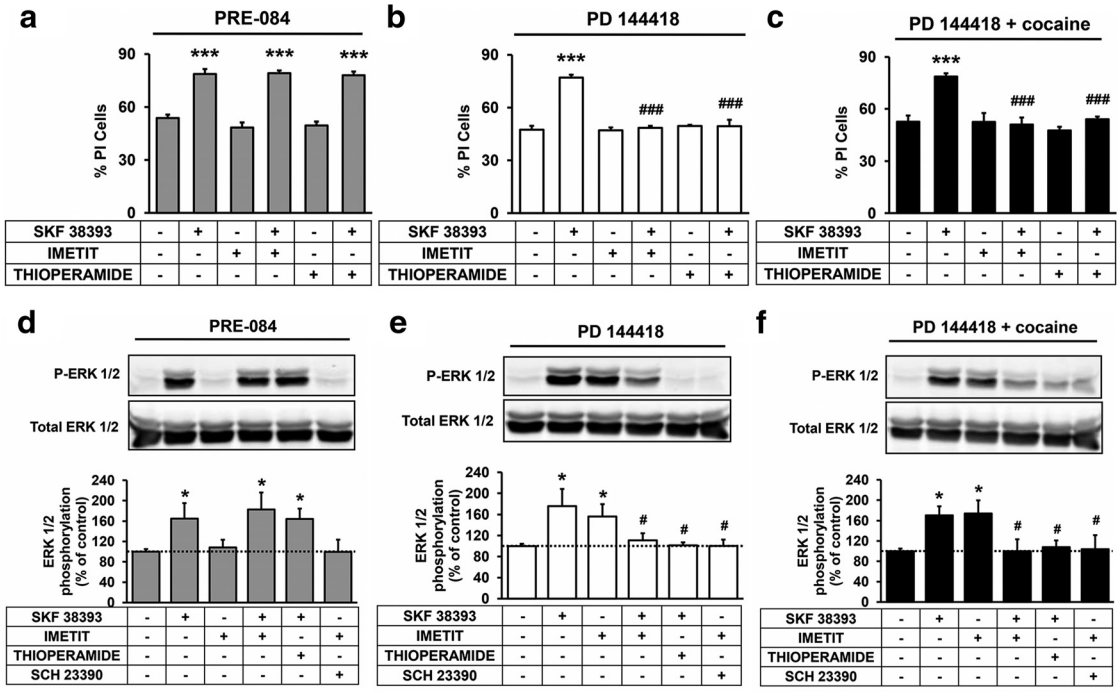


Figure 9. Effect of σ_1R agonist and antagonists on the H_3R-mediated modulation of the D_1R-promoted cell death and signaling in the striatum. Rat striatal organotypic cultures (***a–c***) or striatal slices (***d–f***) were prepared as indicated (see Materials and Methods) and were treated for 1 h with medium (***a***, ***d***) or PD 144418 (10 μM; ***b***, ***c***, ***e***, ***f***) before adding 1 μM PRE-084 (***a***, ***d***), vehicle (***b***, ***e***), or 150 μM cocaine (***c***, ***f***). At 24 h of organotypic culture (***a–c***) or after 2 h of slice incubation (***d–f***) the D_1R antagonist SCH 23390 (50 μM, ***a–c*** or 10 μM, ***d–f***) or the H_3R antagonist thioperamide (10 μM) were added 20 min before the addition of the D_1R agonist SKF 38393 (50 μM, ***a–c*** or 1 μM, ***d–f***) or the H_3R agonist imetit (10 μM, ***a–c*** or 1 μM, ***d–f***) alone or in combination. Striatal organotypic cultures were cultured for an additional 48 h and slices were incubated for an additional 10 min and were processed to determine cell death or ERK 1/2 phosphorylation, respectively, as indicated in Materials and Methods. ***a–c***, Values represent mean ± SEM percentage of PI stained cells versus total DAPI-stained cells determined in four to six fields from two to three independent organotypic cultures. ***d–f***, Values represent mean ± SEM phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices, determined in 3–10 slices obtained from four animals. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests showed a significant ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$) effect over basal (nontreated organotypic cultures or slices) or of the two ligands treatment over the agonist treatment ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$).

1). Since the effect was observed after a short treatment with cocaine, these results suggest that cocaine binding to σ_1R is blocking the allosteric interaction between H_3R and D_1R in the σ_1R-D_1R-H_3R complex.

Effect of cocaine in the H_3R-mediated modulation of D_1R-induced cell death in the striatum

The results above described indicate that H_3R can act as a "molecular brake" of D_1R function by forming heteromers in the rat striatum, blocking the ability of D_1R to signal and that cocaine can remove this brake and allow D_1R to signal unimpeded by H_3R. Ideally we would like to have a physiological readout of these changes in the D_1R-H_3R heteromer function. It has been shown that the dopamine increase due to drug intake is neurotoxic (Cunha-Oliveira et al., 2008) and it has been described that striatal cells are especially vulnerable to dopamine D_1R activation by a nonoxidative process (Paoletti et al., 2008). Here, using organotypic rat striatal cultures we tested the hypothesis that blocking D_1R signaling via H_3R could lead to a change in D_1R overactivation-induced cell death. We first tested the H_3R ligands effect on D_1R-induced cell death in organotypic rat striatal cultures. As indicated in Materials and Methods, we determined cell death by comparing DAPI and PI staining. The D_1R agonist SKF 38393, but not H_3R agonist imetit or the antagonist thioperamide, induced cell death, an effect that was reverted by the D_1R antagonist SCH 23390 (Fig. 8*a*). When SKF 38393 and imetit were added together to the organotypic cultures, imetit blocked the D_1R-mediated cell death (Fig. 8*a*) and the imetit effect was specific for D_1R-mediated cell death as it was not observed in glutamate-induced cell death (Fig. 8*b*). Similar blocking of cell death was observed when SKF 38393 and thioperamide were added together (Fig. 8*a*). Thus, reducing D_1R signaling via H_3R can serve to reduce downstream physiological effects in our organotypic models, indicating that H_3R indeed serves as a "molecular brake" or control point for D_1R function. We next examined whether cocaine could remove this brake performing the same experiments in organotypic cultures treated with 150 μM cocaine. As shown in Figure 8*c*, cocaine was able to disrupt the imetit inhibition of the SKF 38393-promoted cell death without altering the effect of SKF 38393 alone and also blocked the cross-antagonism exerted by the H_3R antagonist thioperamide on SKF 38393-promoted cell death (Fig. 8*c*).

The results above suggest that cocaine's disruption of D_1R-H_3R signaling is an important enough disruption that can translate into pathological consequences. Thus, in cases where altering D_1R signaling might be desired, it could be advantageous to target D_1R-H_3R heteromers via σ_1R. To test this, we analyzed the effect of H_3R ligands on the D_1R agonist SKF 38393-induced cell death in organotypic cultures pretreated with σ_1R agonists and antagonists. The pretreatment with the agonist PRE-084 (1 μM) mimicked the effect of cocaine in the H_3R ligand modulation of D_1R-induced cell death (Fig. 9*a*) and the pretreatment with the antagonist PD 144418 (10 μM), which had no effect in this process (Fig. 9*b*), could block the 150 μM cocaine's effects on the D_1R-H_3R heteromer in our cell death model (Fig. 9*c*). We also analyzed the D_1R-H_3R cross-talk and cross-antagonism in signaling in rat striatal slices pretreated with 1 μM PRE-084 or 10 μM PD 144418 in the absence or in the presence of 150 μM cocaine.

As shown in Figure 9*d*, PRE-084 mimicked cocaine's effect by blocking the negative cross-talk between SKF 38393 and imetit in ERK 1/2 phosphorylation and the cross-antagonism between both receptors. When striatal slices where pretreated with the σ1 receptor antagonist PD 144418 (10 μM) cocaine could no longer block H_3 receptor's control of D1 receptor signaling (Fig. 9*f*). PD 144418 had no effect in the H_3R ligand modulation of D_1R signaling (Fig. 9*e*) suggesting that it was indeed through blockage of cocaine binding. These data strongly suggest that H_3R control of D_1R signaling can be pharmacologically influenced with σ_1R compounds and that σ_1R antagonists may prove effective at reducing the effects of cocaine.

Discussion

From the data presented here four major conclusions can be made. First, σ_1R binds D_1R-H_3R heteromers in transfected cells as well as in mouse and rat striatum. Second, σ_1R agonists, such as cocaine, modify the structure and counteract the biochemical properties of the D_1R-H_3R heteromer, composing of heteromer signaling through G_i protein, the ability of H_3R activation to signal through MAPK, and the ability of H_3R ligands to inhibit the effects of D_1R-mediated signaling, including cell death. Therefore, a third important general conclusion is that blockade of H_3R-mediated inhibition of D_1R function in the σ_1R-D_1R-H_3R complexes plays a key role in the effects of cocaine. Finally, σ_1R-D_1R-H_3R complexes might provide a new target for the treatment of cocaine abuse.

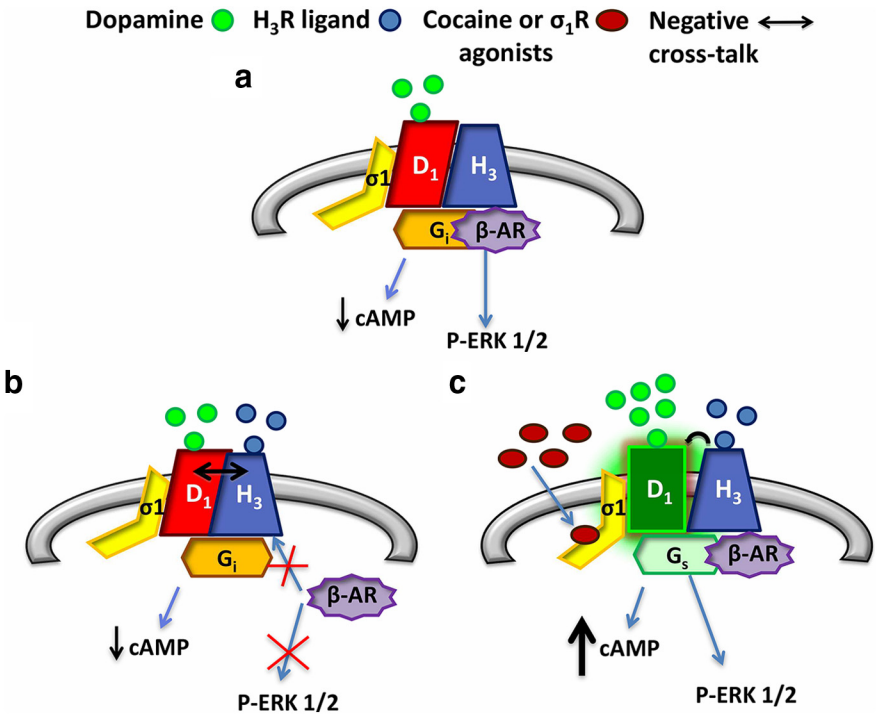


Figure 10. Scheme representing the D_1R signaling in the D_1R-H_3R heteromer in the absence or presence of cocaine. In GABAergic neurons (gray), in the absence of cocaine, H_3R (blue) and D_1R (red) form heteromers to which σ_1R (yellow) can bind. Activation of only the D_1R protomer (***a***) promotes a decrease of cAMP levels in accordance with G_i (orange) coupling of both receptors in the heteromer. Moreover, D_1R activation induces β-arrestin (purple) recruitment and promotes ERK 1/2 phosphorylation. Upon dual stimulation of the heteromer with both H_3R and D_1R agonists in the absence of cocaine (***b***), a negative cross-talk (the ability of one receptor agonist to negatively modulate the partner receptor ligand binding or signaling) between receptors in the heteromer occurs, inhibiting β-arrestin recruitment and subsequently reducing ERK 1/2 phosphorylation from the heteromer. When cocaine (brown) binds to σ_1R (***c***) this induces structural changes in the heteromer disrupting the negative cross-talk. Thus, the H_3R-mediated brake on D_1R is lost, allowing D_1R (green) to couple to G_s (pale green) and increasing cAMP. Importantly, β-arrestin recruitment and ERK 1/2 phosphorylation are also detected in the presence of cocaine.

Cocaine binds with somewhat higher affinity to DAT than to σ_1R; therefore, the role of σ_1R in the addictive properties of cocaine has been a matter of debate. More accepted has been their role in the acute neurotoxic effects of cocaine (for review, see Robson et al., 2012). In fact, σ_1R antagonists provide a protective effect in cocaine-induced convulsions and lethality in rodents (Ritz and George, 1997; Robson et al., 2012). Nevertheless, an important amount of experimental data demonstrates the involvement of σ_1R in many pharmacologic, including rewarding, effects of cocaine (Maurice and Su, 2009; Robson et al., 2012). Repeated cocaine exposure increases the levels of σ_1R in the brain, including the striatum, by a process that depends on the cocaine binding σ_1R (Liu and Matsumoto, 2008), and does not occur in mice with genetic deletion of D_1R (Zhang et al., 2005). Upregulation of σ_1R might underlie the ability of cocaine to induce self-administration of selective σ_1R agonists, which has been invoked as a possible mechanism that contributes to the intractability of psychostimulant abuse (Hiranita et al., 2013). Indeed, we have demonstrated the importance of the σ_1R and D_1R receptor interaction on the initial events upon cocaine exposure (Navarro et al., 2010).

We previously described that in the striatum D_1R can form heteromers with H_3R and that H_3R agonist binding to the D_1R-H_3R heteromers are negatively modulating D_1R function (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011a). The modulation of D_1R signaling by H_3R is thought to serve as a control point that could set the tone of D_1R signaling from a given neuron (Moreno et al., 2011a; Ellenbroek, 2013; Panula and Nuutinen, 2013). However, previous studies using the H_3R ligand imetit have shown that it was not effective at preventing drug seeking in the presence of cocaine, but does prevent drug seeking in the absence of cocaine (Ortiz De Pablo and Self, 2011). Our work here clearly explains the molecular mechanism behind these results and highlights the pleiotropic effects of σ_1R. As stated in Figure 10, H_3R and D_1R form heteromers to which σ_1R can bind. Under normal conditions (in the absence of cocaine), H_3R can serve to control the levels of D_1R signaling altering its coupling to G-proteins. Activating only the D_1R protomer in the heteromer promotes a decrease of cAMP levels in accordance with G_i coupling to the heteromer. In addition, D_1R activation induces β-arrestin recruitment and promotes ERK 1/2 phosphorylation (Fig. 10*a*). However, upon dual stimulation of the heteromer with both H_3R and D_1R agonists in the absence of cocaine, a negative cross-talk between receptors in the heteromer occurs, inhibiting β-arrestin recruitment and subsequently reducing ERK 1/2 phosphorylation from the heteromer (Fig. 10*b*). When cocaine (Fig. 10*c*) binds to σ_1R in the heteromeric complex, it induces structural changes in the heteromer, and disrupts the negative cross-talk. Thus, in the presence of cocaine the H_3R-mediated brake on D_1R is lost. Importantly, cocaine also blocks the dopamine transporter, DAT, in presynaptic terminals. This leads to an increase in extracellular levels of dopamine. This dopamine then can bind

and activate an uninhibited D_1R allowing D_1R to increase cAMP by coupling to G_s protein and increasing p-ERK 1/2, presumably via recruitment of β-arrestin. This uninhibited D_1R is normally balanced by inputs from D_2R-containing neurons. However, we and others have shown that this balance becomes undone in the presence of cocaine (Navarro et al., 2013; Park et al., 2013).

The present study supports the use of σ_1R antagonists as a treatment for cocaine abuse, particularly in the frame of σ_1R modulation of D_1R-H_3R heteromers. In fact, we showed that blockade of σ_1R restores the protective H_3R-mediated brake on D_1R signaling involved in cocaine-induced cell death. Although at the experimental level D_1R seems to be clearly involved in the pharmacological effects of cocaine (Xu et al., 1994; Weiss et al., 2001; Wolf et al., 2003; Bertran-Gonzalez et al., 2008), conflicting results of D_1R antagonists have been observed at the clinical level (Nann-Vernotica et al., 2001), which might be related to the inability to reach therapeutic doses without secondary effects. Antagonists of σ_1R receptors can block cocaine's ability to modulate D_1-H_3 receptor heteromers, providing a means to decrease the overdose-related side effects of orthosteric D_1 receptor antagonists. Our results indicate that a potentially good therapeutic approach for the pharmacologic effects of cocaine could include the association of σ_1R antagonists with H_3 receptor agonists.

References

Aksenov MY, Aksenova MV, Nath A, Ray PD, Mactutus CF, Booze RM (2006) Cocaine-mediated enhancement of Tat toxicity in rat hippocampal cell cultures: the role of oxidative stress and D1 dopamine receptor. Neurotoxicology 27:217–228. CrossRef Medline

Arias-Montaño JA, Floran B, Garcia M, Aceves J, Young JM (2001) Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutyric acid from rat striatal slices. Br J Pharmacol 133:165–171. CrossRef Medline

Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Hervé D, Valjent E, Girault JA (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. J Neurosci 28:5671–5685. CrossRef Medline

Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Agnati L, Cortés A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C, Franco R (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. Nat Methods 5:727–733. CrossRef Medline

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

Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. Nature 494:238–242. CrossRef Medline

Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR (2008) Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. Brain Res Rev 58:192–208. CrossRef Medline

DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007) β-Arrestins and Cell Signaling. Annu Rev Physiol 69:483–510. CrossRef Medline

Ellenbroek BA (2013) Histamine H3 receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. Br J Pharmacol 170: 46–57. CrossRef Medline

Ferrada C, Moreno E, Casadó V, Bongers G, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Leurs R, Ferré S, Lluís C, Franco R (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br J Pharmacol 157:64–75. CrossRef Medline

Ferré S, Agnati LF, Ciruela F, Lluis C, Woods AS, Fuxe K, Franco R (2007) Neurotransmitter receptor heteromers and their integrative role in "local modules": the striatal spine module. Brain Res Rev 55:55–67. CrossRef Medline

Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, Fuxe K, George SR, Javitch JA, Lohse MJ, Mackie K, Milligan G, Pfleger KD, Pin JP, Volkow ND, Waldhoer M, Woods AS, Franco R (2009) Building a new conceptual framework for receptor heteromers. Nat Chem Biol 5:131–134. CrossRef Medline

Franco R, Casadó V, Mallol J, Ferré S, Fuxe K, Cortés A, Ciruela F, Lluis C, Canela EI (2005) Dimer-based model for heptaspanning membrane receptors. Trends Biochem Sci 30:360–366. CrossRef Medline

Franco R, Casadó V, Mallol J, Ferrada C, Ferré S, Fuxe K, Cortés A, Ciruela F, Lluis C, Canela EI (2006) The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. Mol Pharmacol 69:1905–1912. CrossRef Medline

Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. Annu Rev Neurosci 34:441–466. CrossRef Medline

González S, Moreno-Delgado D, Moreno E, Pérez-Capote K, Franco R, Mallol J, Cortés A, Casadó V, Lluís C, Ortiz J, Ferré S, Canela E, McCormick PJ (2012) Circadian-related heteromerization of adrenergic and dopamine D4 receptors modulates melatonin synthesis and release in the pineal gland. PLoS Biol 10:e1001347. CrossRef Medline

Hayashi T, Su T (2005) The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. Curr Neuropharmacol 3:267–280. CrossRef Medline

Hiranita T, Soto PL, Tanda G, Katz JL (2010) Reinforcing Effects of σ-Receptor Agonists in Rats Trained to Self-Administer Cocaine. J Pharmacol Exp Ther 332:515–524. CrossRef Medline

Hiranita T, Mereu M, Soto PL, Tanda G, Katz JL (2013) Self-administration of cocaine induces dopamine-independent self-administration of sigma agonists. Neuropsychopharmacology 38:605–615. CrossRef Medline

Hoffmann HM, Nadal R, Vignes M, Ortiz J (2012) Chronic cocaine self-administration modulates ERK1/2 and CREB responses to dopamine receptor agonists in striatal slices. Addict Biol 17:565–575. CrossRef Medline

Katz JL, Su TP, Hiranita T, Hayashi T, Tanda G, Kopajtic T, Tsai SY (2011) A role for sigma receptors in stimulant self administration and addiction. Pharmaceuticals 4:880–914. CrossRef Medline

Kourrich S, Su TP, Fujimoto M, Bonci A (2012) The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. Trends Neurosci 35:762–771. CrossRef Medline

Kourrich S, Hayashi T, Chuang JY, Tsai SY, Su T-P, Bonci A (2013) Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. Cell 152:236–247. CrossRef Medline

Langa F, Codony X, Tovar V, Lavado A, Giménez E, Cozar P, Cantero M, Dordal A, Hernández E, Pérez R, Monroy X, Zamanillo D, Guitart X, Montoliu L (2003) Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. Eur J Neurosci 18:2188–2196. CrossRef Medline

Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, Salgado TM, Curi R, Planeta CS, Scavone C (2009) Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. Mol Brain 2:3. CrossRef Medline

Liu Y, Matsumoto RR (2008) Alterations in fos-related antigen 2 and sigma1 receptor gene and protein expression are associated with the development of cocaine-induced behavioral sensitization: time course and regional distribution studies. J Pharmacol Exp Ther 327:187–195. CrossRef Medline

Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ (2003) Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. Eur J Pharmacol 469:1–12. CrossRef Medline

Maurice T, Su TP (2009) The pharmacology of sigma-1 receptors. Pharmacol Ther 124:195–206. CrossRef Medline

Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M, Navarro G, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Moratalla R, Ferré S, Ortiz J, Franco R (2011a) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. J Biol Chem 286:5846–5854. CrossRef Medline

Moreno E, Vaz SH, Caí NS, Ferrada C, Quiroz C, Barodia SK, Kabbani N, Canela EI, McCormick PJ, Lluis C, Franco R, Ribeiro JA, Sebastião AM, Ferré S (2011b) Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. J Neurosci 31:7412–7423. CrossRef Medline

Nann-Vernotica E, Donny EC, Bigelow GE, Walsh SL (2001) Repeated administration of the D1/5 antagonist ecopipam fails to attenuate the subjective effects of cocaine. Psychopharmacology 155:338–347. CrossRef Medline

Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol J, Cortés A, Casadó V, Canela EI, Ortiz J, Fuxe K, Lluís C, Ferré S, Franco R (2010) Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 18676–18681. CrossRef Medline

Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, Brugarolas M, Farré D, Aguinaga D, Mallol J, Cortés A, Casadó V, Lluís C, Ferre S, Franco R, Canela E, McCormick PJ (2013) Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. PLoS One 8:e61245. CrossRef Medline

Ortiz De Pablo J, Self DW (2011) Use of H3 histaminergic agonists for the treatment of addiction to drugs of abuse. Accessed June 10, 2013.

Panula P, Nuutinen S (2013) The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. Nat Rev Neurosci 14:472–487. CrossRef Medline

Paoletti P, Vila I, Rifé M, Lizcano JM, Alberch J, Ginés S (2008) Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. J Neurosci 28:10090–10101. CrossRef Medline

Park K, Volkow ND, Pan Y, Du C (2013) Chronic cocaine dampens dopamine signaling during cocaine intoxication and unbalances D1 over D2 receptor signaling. J Neurosci 33:15827–15836. CrossRef Medline

Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2012) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. Nature 481:71–75. CrossRef Medline

Pettit HO, Pan HT, Parsons LH, Justice JB Jr (1990) Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. J Neurochem 55:798–804. CrossRef Medline

Ritz MC, George FR (1997) Cocaine toxicity: concurrent influence of dopaminergic, muscarinic and sigma receptors in mediating cocaine-induced lethality. Psychopharmacology 129:311–321. CrossRef Medline

Robson MJ, Noorbakhsh B, Seminerio MJ, Matsumoto RR (2012) Sigma-1 receptors: potential targets for the treatment of substance abuse. Curr Pharm Des 18:902–919. CrossRef Medline

Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. Biochem J 375:503–515. CrossRef Medline

Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ (2006) Beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. J Biol Chem 281:1261–1273. Medline

Söderberg O, Leuchowius KJ, Gullberg M, Jarvius M, Weibrecht I, Larsson LG, Landegren U (2008) Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. Methods 45:227–232. CrossRef Medline

Takagi H, Morishima Y, Matsuyama T, Hayashi H, Watanabe T, Wada H (1986) Histaminergic axons in the neostriatum and cerebral cortex of the rat: a correlated light and electron microscopic immunocytochemical study using histidine decarboxylase as a marker. Brain Res 364:114–123. CrossRef Medline

Trifilieff P, Rives ML, Urizar E, Piskorowski RA, Vishwasrao HD, Castrillon J, Schmauss C, Slättman M, Gullberg M, Javitch JA (2011) Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. Biotechniques 51:111–118. CrossRef Medline

Volkow ND, Wang GJ, Tomasi D, Baler RD (2013) Unbalanced neuronal circuits in addiction. Curr Opin Neurobiol 23:639–648. CrossRef Medline

Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR (2001) Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Ann N Y Acad Sci 937:1–26. Medline

Williams JM, Galli A (2006) The dopamine transporter: a vigilant border control for psychostimulant action. Handb Exp Pharmacol 215–232. Medline

Wolf ME, Mangiavacchi S, Sun X (2003) Mechanisms by which dopamine receptors may influence synaptic plasticity. Ann N Y Acad Sci 1003:241–249. CrossRef Medline

Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM, White FJ, Tonegawa S (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. Cell 79:945–955. CrossRef Medline

Zhang D, Zhang L, Tang Y, Zhang Q, Lou D, Sharp FR, Zhang J, Xu M (2005) Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. Neuropsychopharmacology 30: 1443–1454. CrossRef Medline

Zimmermann T, Rietdorf J, Girod A, Georget V, Pepperkok R (2002) Spectral imaging and linear un-mixing enables improved FRET efficiency with a novel GFP2-YFP FRET pair. FEBS Lett 531:245–249. CrossRef Medline

3.2 La modulación de receptores D_1 de dopamina vía receptores H_3 de histamina representa una nueva diana terapéutica para la enfermedad de Huntington

David Moreno-Delgado*, Mar Puigdellívol*, Estefanía Moreno, **Mar Rodríguez-Ruiz**, Joaquín Botta, Paola Gasperini, Anna Chiarlone, Lesley A. Howell, Marco Scarselli, Vicent Casadó, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Manuel Guzmán, Carme Lluís, Jordi Alberch, Enric I. Canela, Sílvia Ginés*, Peter J. McCormick*

*Contribuyeron igualmente

Artículo en revisión en la revista *Journal of Clinical Investigation*

En etapas tempranas de la enfermedad de Huntington (HD) se produce una sobreactivación de receptores D_1 (D_1R) que provoca un desequilibrio en la transmisión dopaminérgica y muerte celular. Para reducir la sobreactivación de D_1R, presentamos una nueva estrategia que tiene como diana a los complejos formados por D_1R y receptores de histamina H_3 (H_3R). Utilizando un modelo de células estriatales de HD y cortes organotípicos de cerebros de ratones modelo de HD, descubrimos que la muerte celular inducida por D_1R, así como las cascadas de señalización responsables de esta muerte, son mitigadas por un antagonista de H_3R. Además, encontramos que el heterómero D_1R-H_3R se expresa en animales modelo de HD en etapas tempranas de la enfermedad, pero no en las tardías, hecho que correlaciona con la progresión de la HD. Sorprendentemente, el tratamiento de los ratones modelo de HD con un antagonista de H_3R previno la aparición de déficits cognitivos y motores, así como la pérdida de la expresión del heterómero. Es importante destacar que la expresión de este heterómero fue detectada en muestras humanas de sujetos control y de pacientes con bajo grado de HD, pero no en pacientes con alto grado de HD. En conjunto, estos resultados indican que los heterómeros D_1R-H_3R juegan un papel crucial en el control de la señalización dopaminérgica y representan nuevas dianas para tratar la HD.

Modulation of dopamine D_1 receptors via histamine H_3 receptors represent a novel therapeutic target for Huntington's disease

David Moreno-Delgado[1,3†a], Mar Puigdellívol[2,3,4,7†b], Estefanía Moreno[1,3], Mar Rodríguez-Ruiz[1,3], Joaquín Botta[7], Paola Gasperini[7], Anna Chiarlone[3,6], Lesley A. Howell[8], Marco Scarselli[9], Vicent Casadó[1,3], Antoni Cortés[1,3], Sergi Ferré[5], Manuel Guzmán[3,6], Carme Lluís[1,3], Jordi Alberch[2,3,4], Enric Canela[1,3], Sílvia Ginés[2,3,4†*], Peter J. McCormick[1,3, 7,10†*]

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

2 Department of Biomedical Science, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Institut of Neuroscience, Spain.

3Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas.

4 Institut d´Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).

5National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, MD 21224 Maryland, USA.

6Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica, and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Complutense University of Madrid, Spain.

7School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7TJ.

8School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, Mile End Road, London EC1M 4NS.

9Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa, Pisa, Italy.

10William Harvey Research Institute, Barts and the London School of Medicine, Queen Mary University of London, London EC1M 6BQ, United Kingdom.

† These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Peter J. McCormick: p.mccormick@qmul.ac.uk and Sílvia Ginés: silviagines@ub.edu

a Present Address: UCB BioPharma SPRL, Chemin de Foriest, Braine-l'Alleud, Belgium

b Present Address: Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QW, United Kingdom

Abstract

Early Huntington's disease (HD) stages include over-activation of dopamine D1 receptors (D1R), producing an imbalance in dopaminergic neurotransmission and cell death. To reduce D1R over-activation, here we present a new strategy based on targeting complexes of D1R and histamine H3 receptors (H3R). Using an HD striatal cell model and HD organotypic brain slices we found that D1R-induced cell death, and the activation of signaling cascades responsible for this death, are mitigated by an H3R antagonist. We also found that the D1R-H3R heteromer is expressed in HD animal models at early but not late stages of the disease, correlating with HD progression. Interestingly, treatment of HD mice with an H3R antagonist prevented cognitive and motor learning deficits, as well as the loss of heteromer expression. Importantly, this heteromer target was found expressed in human control subjects and low-grade HD patients, but not high-grade HD patients. Taken together, our results indicate that D1R-H3R heteromers play a pivotal role in controlling dopamine signaling and represent novel targets for treating HD.

One Sentence Summary: The modulation of dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers is a new therapeutic strategy to reduce cell death and prevent cognitive dysfunction in Huntington's disease.

Introduction

Huntington's disease (HD) is a dominant inherited progressive neurodegenerative disorder caused by expansion of a CAG repeat, coding a polyglutamine repeat within the *N*-terminal region of huntingtin protein (*1, 2*). Although dysfunction and death of striatalmedium-sized spiny neurons (MSSNs) is a key neuropathological hallmark of HD (*3, 4*), cognitive deficits appear long before the onset of motor disturbances (*5, 6*). It has been postulated that alterations in the dopaminergic system may contribute to HD neuropathology (*7, 8*), as dopamine (DA) plays a key role in the control of coordinated movements. Increased DA levels and DA signaling occur at early stages of the disease (*7-9*), resulting in an imbalance in striatal neurotransmission initiating signaling cascades that may contribute to striatal cell death (*10, 11*). Several studies demonstrated that DA receptor antagonists and agents that decrease DA content reduce chorea and motor symptoms while dopaminergic stimulation exacerbate such symptoms (*12-14*).

Within the striatum, two different MSSNs populations can be distinguished: 1) MSSNs expressing enkephalin and dopamine D2 receptors (D2R), which give rise to the indirect striatal efferent pathway, and 2) MSSNs expressing substance P and dopamine D1 receptors (D1R), comprising the direct striatal efferent pathway. Recently, several studies with experimental models have changed the traditional view that D2R-MSSNs are more vulnerable in HD (*15, 16*), proposing a new view in which D1R-MSSNs are more vulnerable to the HD mutation. In this view, it has been demonstrated that mutant huntingtin enhances striatal cell death through the activation of D1R but not D2R (*10*). More recently, it has been described that, at early stages of the disease, HD mice show an increase in glutamate release onto D1R neurons but not D2R neurons while, later in the disease, glutamate release is selectively decreased to D1R cells (*17*), indicating that several changes occur in D1R neurons at both early and late disease stages. Strategies that might reduce D1R signaling could prove successful towards preventing HD (*10, 14, 17, 18*). However, D1Rs are highly expressed in many tissues (*19*) and broad use of D1R antagonists as a preventive treatment has important drawbacks including locomotor impairments (*20*), or induce depression, parkinsonism and sedation in HD patients (*12, 21*).

Histamine is an important neuromodulator with four known G protein-coupled receptors (GPCRs). H3Rs are expressed in brain regions involved in both motor function (striatum) and cognition, such as the cortex, thalamus, hypothalamus, hippocampus and amygdala (*22*). We know that in at least striatal GABAergic dynorphinergic neurons (*23-25*), both D1R and H3R are co-expressed. We and others have found that they establish functional negative interactions by forming molecular complexes termed heteromers (*26, 27*). Hence, in this work, we hypothesized that targeting D1R through these receptor complexes of D1R and H3R might serve as a more efficient and targeted strategy that may slow the progression of HD. Specifically, we demonstrate that D1R-H3R heteromers are expressed and functional in early HD stages but are lost in late stages. An H3R antagonist acting through D1R-H3R heteromers acts as a protective agent against dopaminergic imbalance in early stages of HD improving learning and long-term memory deficits and rescuing D1R-H3R complexes lost in the late stages of HD.

Materials and Methods

Human brain slices.

Paraffin-embedded *post-mortem* 4 μm-thick brain sections containing caudate-putamen were obtained and provided by the Tissue Bank at Hospital Universitario Fundación Alcorcón (Madrid, Spain) and the Netherlands Brain Bank (Amsterdam, The Netherlands) according to the standardized procedures of both institutions. The samples analyzed were from patients with HD (1 grade 0; 1 grade 1; 2 grade 2; 3 grade 3 and 3 grade 4 patients) or from age matched controls

with no neurological disease (3 subjects). All protocols were approved by the institutional ethic committees.

Cell cultures.
Conditionally immortalized wild-type STHdhQ7 and mutant STHdhQ111 striatal neuronal progenitor cell lines expressing endogenous levels of normal and mutant huntingtin with 7 and 111 glutamines, respectively, have been described previously (*104*). These cells do not exhibit amino-terminal inclusions allowing the study of changes involved in early HD pathogenesis (*104*). Striatal cells were grown at 33°C in DMEM (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% streptomycinpenicillin, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 400 g/ml G418 (Geneticin; Invitrogen).

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Paisley, Scotland, UK) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin/streptomycin, essential medium non-essential amino acids solution (1/100) and 5% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) and were maintained at 37ºC in an atmosphere with 5% CO2. Cells were transiently transfected with the corresponding fusion protein cDNA using Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

Animal models of HD.
Knock-in mice, with targeted insertion of 109 CAG repeats that extends the glutamine segment in murine huntingtin to 111 residues, and the corresponding littermates having 7 glutamine residues were maintained on a C57BL/6 genetic background (*105*). HdhQ7/Q111 heterozygous males and females were intercrossed to generate age-matched HdhQ7/Q111 heterozygous and HdhQ7/Q7 wild-type littermates. Only males were used for all experiments. Hemizigous male mice transgenic for exon 1 of the human huntingtin gene with a greatly expanded CAG repeat (~115 CAG repeats in R6/1 mice and ~160 CAG repeats in R6/2 mice) (*106*) and wild-type littermates were used when indicated in proximity ligation assays. Animals were housed under a 12 h light/dark cycle with food and water ad libitum. All procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health and were approved by the local animal care committee of the Universitat de Barcelona (99/01) and the Generalitat de Catalunya (00/1094) or the Universidad Complutense de Madrid in accordance with the directives of the European Commission.

Mouse brain slices preparation.
For PLA experiments, 2-, 4-, 6- and 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were deeply anesthetized and immediately perfused transcardially with saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate buffer. Brains were removed and post-fixed overnight in the same solution, cryoprotected by immersion in 10, 20, 30% gradient sucrose (24 hours for each sucrose gradient) at 4ºC and then frozen in dry ice-cooled methylbutane. Serial coronal cryostat sections (30μm) through the whole brain were collected in PBS-0.025% azide as free-floating sections and stored at 4ºC until PLA experiments were performed. For cell death determination, HdhQ7/Q111 and HdhQ7/Q7 mice were killed by cervical dislocation at the age of 4, 5 and 8 months. Mouse brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O2/CO2: 95%/5%) Krebs-HCO3- buffer (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.25 mM NaH2PO4, 1.5 mM MgSO4, 1.5 mM CaCl2, 10 mM glucose and 26 mM NaHCO3, pH 7.4). Cerebral hemisferes were split and sliced coronally using a McIlwain chopper (Ted Pella, Inc, California) in sterile conditions. Striatum, cortex and hippocampal slices (300 μm thick) were kept at 4°C in Krebs-HCO3- buffer during the dissection and transferred into a Millicell Insert (Millipore).

Cell death determination in striatal cells and in mouse organotypic slice cultures.
Striatal STHdhQ7 or STHdhQ111 cells were grown to reach 50 % of confluence on 12-well plates containing 3 cm2-glass coverslips. Medium was then replaced by a new supplemented medium containing 0.5 % FBS. Vehicle, SCH 23390, thioperamide or SB 203580 were added at the

indicated concentrations to cells and incubated for 1 h before the addition of D1R. When TAT-TM peptides were applied to cell cultures, these were added 4 h before the addition of D1R agonist. After agonist addition, an additional incubation period of 24 h was performed. Then cells were washed twice in cold-PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde for 1 h at 4ºC. Sample nuclei were stained with Hoechst 1:1000. Stained cells were then washed with PBS and mounted under glass coverslips with Mowiol. A minimum of 10 fields were taken from each coverslip using a fluorescence microscope and the plugin Image-based Tool for Counting Nuclei for ImageJ was used for the quantification of the total nuclei. In mouse organotypic cultures, brain slices (300 □ m thickness, see above) were cultured for 24 h into a Millicell Insert in Neurobasal medium supplemented with 20 % horse serum, 0.5% B27, 2 mM L-glutamine, 100 µg/ml sodium pyruvate, non-essential amino acids solution (1/100) and 100 units/ml penicillin/streptomycin (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) before replacing with fresh medium. Vehicle, SCH 23390, thioperamide were added at the indicated concentrations to organotypic cultures and incubated for 1 h before the addition of D1R agonist. TAT-TM peptides were applied to cell cultures 4 h before the addition of D1R agonist. After agonist addition, an additional incubation period of 48 h was performed. Then, 10□ M propidium iodide (PI) was added to organotypic cultures and maintained at 37ºC for 1 h. Organotypic cultures were washed twice in cold-PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde for 1 h at 4ºC. Total nuclei were stained with Hoechst 1:1000. The Hoechst stained and PI positive nuclei in organotypic cultures were counted to evaluate cell death in the brain slices. Quantification was performed using Leica SP2 confocal microscope (20x; UV, 561 lasers) and the quantification performed with the program Image-based Tool for Counting Nuclei for ImageJ. Cell death is expressed as the percentage of PI positive cells in the total Hoechst-stained nuclei.

Lentivirus production and cell transduction.

Silencing lentiviral vectors were produced by co-transfecting HEK293 producing cellsT with lentiviral silencing plasmids GIPZ Human histamine H3 receptor shRNA (Clone V3LHS_638095 or Clone V3LHS_638091, Thermo Scientific) with packing plasmid psPAX2 and envelope coding plasmid pMD2.G (Addgene#12260 and #12259, respectively) using the calcium phosphate method. For production of control non silencing lentiviral particles the H3R silencing plasmid were substituted with GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control (RHS4346, Thermoscientific). Infectious lentiviral particles were harvested at 48 h post-transfection, centrifuged 10 minutes at 900 g to get rid of cell debris, and then filtered through 0.45 µm cellulose acetate filters. The titer of recombinant lentivirus was determined by serial dilution on HEK293T cells. For lentivirus transduction, striatal cells were subcultured to 50% confluence, cells were transduced with H3R-shRNA-expressing lentivirus obtained with plasmid (Clone V3LHS_638095) or control-shRNA-expressing lentivirus (LV control) at a multiplicity of infection (MOI) of 10 in the presence of polybrene 5 µg/ml. Virus-containing supernatant was removed after 3 h. Puromycin was added to the culturing media at the final concentration of 1 µg/ml 2 days after infection. 5 days after puromycin selection cells were transduced with the second H3R-shRNA-expressing lentivirus obtained with plasmid Clone V3LHS_638091 to improve the level of silencing achieved. LV control infected cells were re-infected with control-shRNA-expressing lentivirus. The second infection was carried out as the first one. Cells were tested 72 h after the second transduction was performed.

RNA and real-time PCR.

RNA was extracted using TRIzol Reagent (Molecular Research Center). 10 µg of total RNA were treated with RQ1 RNAse free DNAse (Promega) according to manufacturer instruction. DNAse treated DNA was quantified again and cDNA was synthesized using 2 µg total RNA with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; (Applied Biosystems). The mRNAs of actin, H3R and D1R were amplified by real-time (RT)-PCR using 1 µL cDNA and power SYBER green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on a 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems). Primer

sequences are as follows: MsACT For: ATGAGCTGCCTGACGGCCAGGTCAT, MsACT Rev: TGGTACCACCAGACAGCAC TGTGTT, H3R For: GCAACGCGCTGGTCATGCTC, H3R Rev: CCCCGGCCAAAGGTCCAACG, D1R FOR: ACCTCTGTGTGATCAGCGTG, AND D1R REV: GCGTATGTCCTGCTCAACCT. Thermal cycling conditions for amplification were set at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, respectively. PCR denaturing was set at 95°C for 15 s and annealing/extending at 60°C for 60 s for 40 cycles. mRNA levels normalized for actin are expressed as fold change relative to control cells. The results were quantified with the comparative *C*t method (known as the 2−δδCt method).

In Situ Proximity Ligation Assays (PLA).

Cells or mouse or human brain slices were mounted on glass slides and treated or not with the indicated concentrations of receptor ligands or TAT-TM peptides for the indicated time. Then, cells or slices were thawed at 4ºC, washed in 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized with TBS containing 0.01% Triton X-100 for 10 min and successively washed with TBS. Heteromers were detected using the Duolink II in situ PLA detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden) following the instructions of the supplier. A mixture of equal amounts of the primary antibodies: guinea pig anti-D1R antibody (1/200 Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan) and rabbit anti-H3R antibody (1:200, Alpha diagnostic, San Antonio, Texas, USA) were used to detect D1R-H3R heteromers together with PLA probes detecting guinea pig or rabbit antibodies, Duolink II PLA probe anti-guinea pig minus and Duolink II PLA probe anti-rabbit plus. Then samples were processed for ligation and amplification with a Detection Reagent Red and were mounted using a DAPI-containing mounting medium. Samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (N.A. 1.4), and a 405 nm and a 561 nm laser lines. For each field of view a stack of two channels (one per staining) and 9 to 15 Z stacks with a step size of 1 μm were acquired. For PLA with brain slices, after image processing, the red channel was depicted in green color to facilitate detection on the blue stained nucleus and maintaining the color intensity constant for all images. A quantification of cells containing one or more spots versus total cells (blue nucleus) and, in cells containing spots, the ratio r (number of red spots/ cell containing spots) were determined, using the Fiji package (http://pacific. mpi-cbg.de/), considering a total of 600-800 cells from 4-10 different fields within each brain region from 3 different mice per group or from 3 human control subjects, 3 human grade 3 or grade 4 HD patients, 2 grade 0 or grade 1 HD patients or 1 grade 2 HD patient. Nuclei and spots were counted on the maximum projections of each image stack. After getting the projection, each channel was processed individually. The nuclei were segmented by filtering with a median filter, subtracting the background, enhancing the contrast with the Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) plug-in and finally applying a threshold to obtain the binary image and the regions of interest (ROI) around each nucleus. Red spots images were also filtered and thresholded to obtain the binary images. Red spots were counted in each of the ROIs obtained in the nuclei images.

Membrane preparation and radioligand binding.

Striatal cells or mouse striatal, cortical or hippocampal tissue were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (1/1000, Sigma). The cellular debris was removed by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000 g for 1 h at 4 °C. Membranes were washed three more times at the same conditions before use. Ligand binding was performed with membrane suspension (0.2 mg of protein/ml) in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4 containing 10 mM MgCl2, at 25ºC. To obtain saturation curves, membranes were incubated with increasing free concentrations of [3H] SCH 23390 (0.02 nM to 10 nM, PerkinElmer, Boston, MO, USA) or [3H]R-a-methyl histamine (0.1 nM to 20 nM [3H]RAMH, Amersham, Buckinghamshire, UK) providing enough time to achieve stable

equilibrium for the lower ligand concentrations. Nonspecific binding was determined in the presence of 30 µM non-labeled ligand. Free and membrane bound ligand were separated by rapid filtration of 500 µl aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% polyethylenimine that were subsequently washed for 5 s with 5 ml of ice-cold Tris–HCl buffer. The filters were incubated overnight with 10 ml of Ecoscint H scintillation cocktail (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 1600 scintillation counter (PerkinElmer, Boston, MO, USA) with an efficiency of 62%. Protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard. Monophasic saturation curves were analyzed by non-linear regression, using the commercial Grafit software (Erithacus Software), by fitting the binding data to the equation previously deduced (equation (3) in (*107*).

Immunocytochemistry.
Cells (60% confluence) were treated with vehicle or 30 µM SKF 81297 and after 45 min cells were kept at 4 °C to block endocytosis/exocytosis, washed twice in cold-PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. After permeabilization with buffer A containing 0.05% Triton X-100 for 5 min, cells were washed with buffer A containing 1% bovine serum albumin (blocking solution) for 1 h and labeled with the primary guinea pig anti-D1R antibody (1/100, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan, ON at 4°C), washed with blocking solution, and stained with the secondary goat Alexa Fluor 488 anti-guinea pig antibody (1:100, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA, 2 h at RT). Samples were washed twice with blocking solution, once with buffer A and finally with PBS. Nuclei were stained with 1:1000 Hoechst. Cells were mounted with Mowiol and observed in a Leica SP2 confocal microscope.

Signaling in striatal cells.
To determine ERK 1/2 phosphorylation, cells (35,000/well) were cultured with a non-supplemented medium overnight before pre-treated at 25°C for 20 min with the antagonists, and stimulated for an additional 7 min with the indicated agonists. Phosphorylation was determined by alpha-screen bead-based technology using the Amplified Luminiscent Proximity Homogeneous Assay kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and the Enspire Multimode Plate Reader (PerkinElmer) following the instructions of the supplier. To determine calcium release, striatal cells were transfected with 4 µg of GCaMP6 calcium sensor (*108*) using lipofectamine 3000. After 48 h, cells were incubated (0.2 mg of protein/ml in 96-well black, clear bottom microtiter plates) with Mg+2-free Locke's buffer pH 7.4 (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO3, 2.3 mM CaCl2, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 µM glycine. When TAT-TM peptides treatment was performed they were added 1 hour before the addition of receptor ligands at the indicated concentration. Fluorescence emission intensity of GCaMP6s was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Boston, MO, USA) for 330 s every 5 s and 100 flashes per well. The fluorescence gain was defined as a delta function of $\Delta F/F(t) = (F(t) - F0)/F0$, where F0 is the average fluorescence intensity in the first six measures from the start of recording and F(t) is the fluorescence intensity at a given time and was expressed in %**.** To determine p38 phosphorylation, striatal cells (80 % confluence) were cultured with a non-supplemented medium 4 h before the addition of the indicated ligand concentration for the indicated time and were lysed with 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerophosphate, 1% Triton X-100, 20 µM phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO4 and protease inhibitor cocktail. Lysates (20 µg protein) were processed for Western blot a mixture of a rabbit anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) antibody (1:1000, Cell Signaling) and a mouse anti-□ -tubulin antibody (1:10,000, Sigma). Bands were visualized by the addition of a mixture of IRDye 680 anti-rabbit antibody (1:10,000, Sigma) and IRDye 800 anti-mouse antibody (1:10,000, Sigma) for 2 h at room temperature and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-

COR Biosciences). Band densities were quantified using the Odyssey scanner software. The level of phosphorylated p38 MAPK was normalized for differences in loading using the β-tubulin band intensities.

Mice thioperamide treatment.
Thioperamide maleate salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was prepared fresh daily being dissolved in sterile 0,9% saline (NaCl) in order to deliver a final dose of 10 mg/kg in a final volume of 0.01 ml/g of body weight, as previously described (*109*). The vehicle treatment consisted of an equal volume of saline solution. All injections were given via the intra-peritoneal route (*i.p*). Three *i.p* injections per week were administered to wild-type HdhQ7/Q7 and mutant knock-in HdhQ7/Q111 mice from 5 months of age until 6 months of age (when one cohort of animals was perfused to analyze PLA after behavioral assessment) or until 8 months of age (when a second cohort of animals were perfused to analyze PLA at this more advanced disease stage). A total of 11 saline-HdhQ7/Q7 mice, 10 thioperamide-HdhQ7/Q7 mice, 7 saline-HdhQ7/Q111 mice and 9 thioperamide-HdhQ7/Q111 mice were treated. For these experiments, a total of 11 saline-HdhQ7/Q7 mice, 10 thioperamide-HdhQ7/Q7 mice, 7 saline-HdhQ7/Q111 mice and 9 thioperamide-HdhQ7/Q111 mice were treated. Similarly, three *i.p* injections per week were administered to wild-type HdhQ7/Q7 and mutant knock-in HdhQ7/Q111 mice from 7 months of age until 8 months of age to perform the behavioral studies when the D1R-H3R heteromers were lost. For these experiments, a total of 11 saline-HdhQ7/Q7 mice, 12 thioperamide-HdhQ7/Q7 mice, 10 saline-HdhQ7/Q111 mice and 11 thioperamide-HdhQ7/Q111 mice were treated. All treatments were performed in the afternoon to avoid the stress caused by the treatments during the behavioral assessment. Thus, during behavioral analysis treatments were performed after the evaluation of motor learning or cognitive tasks.

Behavior assays.
Accelerating rotarod was performed as previously described (*44*). Animals were placed on a motorized rod (30mm diameter). The rotation speed gradually increased from 4 to 40 rpm over the course of 5 min. The time latency was recorded when the animal was unable to keep up on the rotarod with the increasing speed and fell. Rotarod training/testing was performed as 4 trials per day during 3 consecutive days. A resting period of one hour was left between trials. The rotarod apparatus was rigorously cleaned with ethanol between animal trials in order to avoid odors.

For T-maze spontaneous alternation task (T-SAT), the T-maze apparatus used was a wooden maze consisting of three arms, two of them situated at 180° from each other, and the third, representing the stem arm of the T, situated at 90° with respect to the other two. All arms were 45 cm long, 8 cm wide and enclosed by a 20 cm wall. Two identical guillotine doors were placed in the entry of the arms situated at 180°. In the training trial, one arm was closed (new arm) and mice were placed in the stem arm of the T (home arm) and allowed to explore this arm and the other available arm (old arm) for 10 min, after which they were returned to the home cage. After 5 h (LTM), mice were placed in the stem arm of the T-maze and allowed to freely explore all three arms for 5 min. The arm preference was determined by calculating the time spent in each arm x 100/time spent in both arms (old and new arm). The T-maze was rigorously cleaned with ethanol between animal trials in order to avoid odors.

Novel object recognition test (NORT) consisted in a white circular arena with 40 cm diameter and 40 cm high. Mice were first habituated to the open field arena in the absence of objects (2 days, 15 min/day). During these two days of habitation, several parameters were measured to ensure the proper habituation of all mice in the new ambient. As a measure of anxiety or motivation behaviors, the distance that each mice rove in the periphery or in the center of the open field arena was measured as the rove distance in the periphery or in the center x 100/the total distance. The same analysis was performed by counting the number of entries in the periphery and in the center as well as the time that each mice spent exploring the periphery or the center. The total distance

that each mice rove during this two days of habituation was also recorded as a measure to evaluate spontaneous locomotor activity. On the third day, two similar objects were presented to each mouse during 10 min (A, A' condition) after which the mice were returned to their home cage. Twenty-four hours later (LTM), the same animals were re-tested for 5 min in the arena with a familiar and a new object (A, B condition). The object preference was measured as the time exploring each object × 100/time exploring both objects. The arena was rigorously cleaned with ethanol between animal trials in order to avoid odors. Animals were tracked and recorded with SMART junior software (Panlab, Spain).

Immunohistochemistry, confocal microscopy and immunofluorescence-positive puncta counting.

Saline and thioperamide-treated heterozygous mutant HdhQ7/Q111 and WT HdhQ7/Q7 mice at 6 months of age (n = 3 per group) were deeply anesthetized and immediately perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA)/ phosphate buffer. Brains were removed and postfixed overnight in the same solution, cryoprotected by immersion in 30% sucrose and then frozen in dry ice-cooled methylbutane. Serial coronal cryostat sections (30 μm) through the whole brain were collected in PBS as free-floating sections. Sections were rinsed three times in PBS and permeabilized and blocked in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 3% normal goat serum (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) for 15 min at room temperature. The sections were then washed in PBS and incubated overnight at 4°C with Spinophilin (1:250, Millipore) antibody that were detected with Cy3 anti-rabbit secondary antibodies (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). As negative controls, some sections were processed as described in the absence of primary antibody and no signal was detected. Confocal microscopy analysis and immunofluorescence-positive puncta counting spinophilin-positive spine-like structures was examined as previously described (*44*). Briefly, the images were acquired with Zeiss LSM510 META confocal microscope with HeNe lasers. Images were taken using a ×63 numerical aperture objective with ×4 digital zoom and standard (one Airy disc) pinhole. Three coronal sections (30 μm thick) per animal (n=3 per group) spaced 0.24 mm apart containing the motor area M1 or CA1 hippocampus were used. For each slice, we obtained three fields/cortical layer (I, II/III and V) of the M1 area and three fields/CA1 hippocampus (*stratum oriens* and *stratum radiatum*). The number and area of spinophilin-positive puncta were measured using NIH ImageJ version 1.33 by Wayne Rasband (National Institutes of Health, ethesda, MD). To analyze spinophilin immunolabeling, brightness and contrast of fluorescence images were adjusted so that only punctate fluorescence but no weak diffuse background labeling was visible. In the article, we use the term 'puncta' and 'cluster' interchangeable to refer to discrete points of protein at the fluorescence microscope. Positive puncta/cluster within a specific field was recognized by identifying the presence of overlapping 10–100 pixels.

Western blot analysis.

Saline and thioperamide-treated heterozygous mutant HdhQ7/Q111 and WT HdhQ7/Q7, mice were killed by cervical dislocation at 6 months of age, after behavioral assessment. Brains were quickly removed, dissected, frozen in dry ice and stored at −80°C until use. Protein extraction (n = 5-9 per group, only males) and western blot analysis were performed as previously described (*44*). The primary antibody 1C2 (1:1000, Millipore) was used. Loading control was performed by reproving the membranes with an antibody to α-actin (1:20.000, MP Biochemicals). ImageJ software was used to quantify the different immunoreactive bands relative to the intensity of the α- actin band in the same membranes within a linear range of detection for the enhanced chemiluminiscent kit reagent. Data are expressed as the mean ± SEM of band density.

Results

Functional D1R-H3R heteromers are expressed in wild type STHdHQ7 and HD model STHdHQ111 striatal cells

To test whether D1R-H3R heteromers could indeed be targets for controlling D1R signaling in HD, we first analyzed the expression of both receptors in immortalized striatal cells expressing endogenous levels of full-length wild-type STHdHQ7 or mutant STHdHQ111 huntingtin (*28*). Ligand binding determined that both STHdHQ7 and STHdHQ111 cells endogenously express similar levels of D1R and H3R (Supplemental Table 1). By proximity ligation assays (PLA), D1R-H3R heteromers were detected as red spots surrounding the blue stained nuclei in both cell types **(Fig. 1A, left panels of both cell types**) and in cells treated with control lentivirus vector **(Fig. S1A**) but not in cells depleted of H3R (**Fig. 1A, right panels of both cell types**) by shRNA, as shown by RT-PCR and functionality **(Fig. S1 B, C)**, or in negative controls **(Fig. S1D)**. To ensure that D1R-H3R heteromers were functional in STHdH cells, cell signaling experiments were performed. Using both STHdHQ7 and STHdHQ111 cells and concentrations of ligands previously shown to be optimal for receptor activation of the ERK1/2 pathway (*26, 29, 30*), we observed that the D1R agonist SKF 81297 was able to increase ERK1/2 phosphorylation whereas it was prevented by D1R antagonist SCH 23390, and by the H3R antagonist thioperamide **(Fig. S2A, B)** via cross-antagonism. In addition, we tested a previously described alternative signaling pathway activated downstream of D1R, Ca2+ mobilization (*31, 32*). When cells were treated with the D1R agonist SKF 81297 a robust and rapid increase in cytosolic Ca2+ was detected in both STHdHQ7 and STHdHQ111 cells **(Fig. 1B, C)**. Importantly, this calcium release could be dampened with the H3R antagonist thioperamide (cross-antagonism) **(Fig. 1B, C)**. The above signaling data strongly support the presence of functional D1R-H3R heteromers in STHdH cells.

To further demonstrate that an H3R antagonist is dampening D1R activation involving D1R-H3R heteromers, we evaluated the effect of interfering peptides, which are synthetic peptides with the amino acid sequence of domains of the receptors involved in the heteromeric interface. This approach has been used by us and others to disrupt other heteromer complexes (*33-37*). In a previous study we showed the efficacy of this approach in demonstrating heteromerization of D1R with D3R, using a peptide with the sequence of D1R transmembrane domain 5 (TM5) but not TM7 (*33*). We therefore investigated whether synthetic peptides with the sequence of TM5, and TM7 (as a negative control) of D1R, fused to HIV-TAT, were also able to disrupt receptor D1R-H3R heteromers measured by PLA. In agreement with our hypothesis, there was a near complete loss in fluorescence when STHdHQ7 and STHdHQ111 cells were incubated with TAT-TM 5 peptide **(Fig. 1D, F**), but not for the negative control in which the TAT-TM 7 peptide was used **(Fig. 1H, J).** We next evaluated whether TM5 or TM7 would interfere with the observed cross-antagonism in calcium mobilization assays. Clearly, pretreatment of both STHdHQ7 and STHdHQ111 cells with the TAT-TM5 **(Fig. 1E, G)** but not TAT-TM7 **(Fig. 1I, K)** peptide disrupts the ability of the H3R antagonist thioperamide to dampen D1R calcium signaling. These results support that TM5 forms part of the interface of the D1R-H3R heteromer and demonstrate that the H3R antagonist effect is driven through direct interaction between D1R and H3R.

H3R ligands prevent the D1R-induced cell death in STHdHQ7 and STHdQ111 cells

It has been previously reported that upon activation of D1R, STHdH cell viability is reduced (*10*). To explore whether H3R ligands could impair D1R through D1R-H3R heteromers in a pathologically relevant readout, we used D1R-induced cell death as an output of D1R activation in STHdH cells. As expected, STHdH cell viability decreased when treated with the D1R agonist SKF 81297 in a concentration-dependent manner **(Fig. S2C)**. Significant cell death did not occur until 30 μM SKF 81297 was used **(Fig.S2C)**, an effect prevented by the D1R antagonist SCH 23390 **(Fig. S2E)**. Pre-treatment with the H3R antagonist thioperamide, which did not modify

cell viability when administered alone **(Fig. S2E)**, increased the number of surviving cells in the presence of the D1R agonist SKF 81297 in both cell types **(Fig. 1L, M and Fig. S2D)**. Importantly, the effect of the H3R antagonist thioperamide was specific since no protection from D1R agonist-induced cell death was observed in cells depleted of H3R with shRNA lentiviral infection **(Fig. 1L, M),** but was observed in cells transfected with the control lentivirus **(Fig. S2F)**. In addition, we also demonstrated that recovery of viability induced by the H3R antagonist thioperamide was mediated by D1R-H3R heteromers since pre-incubation with D1R TM5 peptide, but not D1R TM7 impaired the H3R antagonist protection from D1R agonist-induced cell death **(Fig. 1L, M)**.

To better understand the mechanisms involved in D1R-H3R heteromer action, we determined which cellular signaling pathways are implicated in the cross-antagonism of H3R upon activation of D1R. Both concentrations of the D1R agonist SKF 81297, cytotoxic (30 μM) and non-cytotoxic (1 μM), can induce intracellular calcium release, which is more pronounced and persistent at 30 μM **(Fig. S4A and B)**. As occurred at 1 μM SKF 81297 **(see Fig. 1)**, the calcium release induced by 30 μM SKF 81297 was also blocked by the H3R antagonist thioperamide **(Fig. S3A and B)**. A correlation between the intensity of calcium responses and the activation of apoptotic pathways such as p38 (*38*) has been previously demonstrated. Thus, we measured changes in p38 phosphorylation levels using both concentrations of the D1R agonist SKF 81297 **(Fig. S4C and D)**. Interestingly, we found that increased phosphorylation of p38 only occurred at the cytotoxic concentration of SKF 81297. Treatment with the H3R antagonist thioperamide reduced p38 phosphorylation upon D1R activation in both cell types **(Fig. S3C)**. Moreover, the p38 inhibitor SB 203580 blocked p38 phosphorylation **(Fig. S3C)** and protected against the cytotoxic effect of the D1R agonist SKF 81297 in a dose-dependent manner **(Fig. S3D)**, confirming that p38 is a key pathway involved in D1R-mediated cell death in these cells.

Overstimulation of D1R induces receptor internalization promoting rapid intracellular signaling (*39*), and D1R expression is decreased in several models of HD (*40*). Receptor internalization can activate secondary signaling pathways (*41*). To test whether changes in receptor trafficking might be at play we analyzed whether 30 μM SKF 81297 can induce D1R internalization in the striatal cells. We observed that 30 μM SKF 81297, that decreased cell viability, promoted D1R internalization in both STHdh cells **(Fig. S5A)**. Interestingly, the 30 μM SKF 81297-induced D1R internalization correlated with D1R-H3R heteromer disruption evidenced by a lack of PLA staining in both STHdH cells treated with 30 μM SKF 81297 **(Fig. S5B)**. One potential way by which GPCRs can influence each other in a heteromer is by altering the trafficking of the partner receptor (*42*). Pre-treatment with the H3R antagonist thioperamide restored the number of punctate PLA spots decreased after overstimulation with the D1R agonist SKF 81297 **(Fig. S5B)**. These results suggest that H3R ligands are inhibiting D1R internalization and D1R-mediated cell death by inhibiting p38 phosphorylation and calcium signaling.

Functional D1R-H3R heteromers are expressed in wild-type HdhQ7/Q7 and in mutant knock-in HdhQ7/Q111 mice at early but not late HD stages

To test whether D1R-H3R heteromers can indeed be targets for treating HD, we investigated their expression and function in the striatum, cerebral cortex and hippocampus of a widely accepted preclinical model of HD, the heterozygous mutant knock-in HdhQ7/Q111 mice, and their wild-type HdhQ7/Q7 littermates (*43, 44*). By PLA we confirmed that both HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice display D1R-H3R heteromers at 2 months (mo) **(Fig. S6)** and 4 mo **(Fig. 2A)** of age in all brain regions tested. No signal was observed in negative controls in which one of the PLA primary antibodies were missing **(Fig. S7)**. Heteromer expression was similar in all brain areas and no differences were observed between genotypes at 4 mo of age **(Fig. 2B)**. Surprisingly, an almost complete loss of D1R-H3R heteromers was found in 6 mo and 8 mo-old HdhQ7/Q111 mice but not in HdhQ7/Q7 mice **(Fig. S8 and Fig. 3A and B)**, indicating that at more advanced

disease stages the D1R-H3R heteromer is lost. Although at 8 mo of age we detected a partial decrease in striatal D1R expression in HdhQ7/Q111 compared with HdhQ7/Q7 mice using ligand binding experiments **(Supplemental Table 2)**, the loss of heteromer expression is not due to a complete loss of receptor expression since by radioligand binding **(Supplemental Table 2)** and mRNA expression analysis **(Supplemental Table 3)** both receptors continue to be expressed.

To test the role of D1R-H3R heteromers, organotypic mouse striatal, cortical and hippocampal cultures were obtained. Cell death was induced by the D1R agonist SKF 81297 (50 μM), and analysis of DAPI and propidium iodide staining was performed. As expected, D1R agonist SKF 81297 treatment increased the percentage of cell death in all three regions compared to vehicle-treated organotypic cultures without significant differences between genotypes at 4 mo of age **(Fig. 2C)**. Importantly, slices pre-treated with the H3R antagonist thioperamide, that does not modify cell death when administered alone, protected cells from D1R elicited cell death **(Fig. 2C)**, indicating that functional D1R-H3R heteromers are expressed in different brain areas of HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice at early disease stages. The dramatic change in heteromer expression in 8 mo-old HdhQ7/Q111 mice was mirrored by the lack of protection of the H3R antagonist thioperamide against SKF 81297-induced cell death in organotypic cultures **(Fig. 3C)**, corroborating that the presence of D1R-H3R heteromers is needed for the H3R antagonist to prevent D1R-mediated cell death.

Treatment with thioperamide prevents cognitive and motor learning deficits at early disease stages

To test whether the H3R antagonist thioperamide can exert beneficial effects in the initial stages of the disease we evaluated the effect of chronic thioperamide treatment on motor learning and memory deficits in mutant HdhQ7/Q111 mice. Since cognitive decline is observed in these HD mice from 6 mo of age (*43-45*) and the D1R-H3R heteromers are expressed and functional until the age of 5 mo (**Fig. S9A and B**), we chose 5 mo-old animals to start the thioperamide treatment (**Fig. S10)**. Corticostriatal function in saline and thioperamide-treated HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice was analyzed by using the accelerating rotarod task that evaluates the acquisition of new motor skills (*44*). Saline-treated mutant HdhQ7/Q111 mice were unable to maintain their balance on the rotarod as wild-type HdhQ7/Q7 mice revealing impaired acquisition of new motor skills **(Fig. 4A)**. Chronic treatment with thioperamide completely rescued motor learning deficits in mutant HdhQ7/Q111 mice as evidenced by a similar latency to fall in the accelerating rotarod as wild type HdhQ7/Q7 mice. Next, recognition long-term memory (LTM) was analyzed by using the novel object recognition test (NORT) **(Fig. 4B)**. After two days of habituation in the open field arena **(Fig. S11A, B, C, D and Fig. S10E, F, G, H)**, no significant differences were found between genotypes and/or treatments, demonstrating no alterations in motivation, anxiety or spontaneous locomotor activity. After habituation, animals were subjected to a training session in the open field arena in the presence of two similar objects (A and A'). Both saline and thioperamide-treated wild-type HdhQ7/Q7 and mutant HdhQ7/Q111 mice similarly explored both objects indicating neither object nor place preferences existed **(Fig. 4B)**. After 24 h, LTM was evaluated by changing one of the old objects (A') for a novel one (B). Whereas saline-treated HdhQ7/Q111 mice did not show any preference for the novel object with respect to the familiar one, indicating recognition LTM deficits, thioperamide treatment completely prevented this LTM deficit in mutant HdhQ7/Q111 mice **(Fig. 4B)**. Next, spatial LTM was analyzed using the T-maze spontaneous alternation task (T-SAT) **(Fig. 4C)**. During the training, similar exploration time **(Fig. 4C, left panel)** and similar number of arm entries **(Fig. S12, left panel)** were found in all genotypes and treatments. After 5 h, a testing session showed that saline-treated HdhQ7/Q111 mice had no preferences between the novel arm and the old arm, indicating spatial LTM deficits **(Fig. 4C, right panel)**. Interestingly, mutant HdhQ7/Q111 mice treated with thioperamide spent more time in the novel *versus* the old arm, revealing preserved LTM **(Fig. 4C,**

right panel). Overall, these data demonstrate the effectiveness of thioperamide treatment in restoring motor learning and preventing spatial and recognition LTM deficits in HdhQ7/Q111 mice.

We next tested if the reversion of the HD phenotype in mutant HdhQ7/Q111 mice induced by thioperamide treatment correlated with the preservation of D1R-H3R heteromer expression. By PLA we observed that in saline-treated 6-mo-old HdhQ7/Q111 mice the heteromer expression was significantly diminished with respect to the age-matched HdhQ7/Q7 mice **(Fig. S8A and B)**. Notably, treatment with thioperamide significantly prevented the loss of D1R-H3R heteromers in all brain regions analyzed in HdhQ7/Q111 mice at both 6 **(Fig. 4D and E)** and 8 mo of age **(Fig. S13A and B)**, suggesting that the altered trafficking observed in cells may potentially also occur in vivo.

Treatment with thioperamide ameliorates spinophilin-immunoreactive puncta alterations in the motor cortex and hippocampus of 6-month-old mutant HdhQ7/Q111 mice

Alterations in dendritic spine dynamics, density and morphology are critically involved in the synaptic deficits present in HD (*44-52*). We recently described a significant decrease in dendritic spine density in the hippocampus (*45*) and the motor cortex of mutant HdhQ7/Q111 mice (*44*) without significant alterations in the striatum. To analyze whether the improvement of motor learning and memory deficits observed in thioperamide-treated mutant HdhQ7/Q111 mice was associated with a recovery in the density of dendritic spines, spinophilin immunostaining was performed in CA1 hippocampal and motor cortical coronal slices obtained from 6-mo-old wild-type HdhQ7/Q7 and mutant HdhQ7/Q111 (**Fig. 5A and B and Fig. S14A**). This methodology was used by us and others to identify structural alterations in dendritic spines (*44, 53, 54*). Confocal microscopy analyses revealed a significant reduction in the density of spinophilin-immunoreactive puncta in the *stratum radiatum* (apical dendrites of CA1 pyramidal neurons) and *stratum oriens* (basal dendrites of CA1 pyramidal neurons) of saline-treated 6-mo-old mutant HdhQ7/Q111 mice compared to saline-treated wild-type HdhQ7/Q7 mice (**Fig. 5A and Fig. S14A**). Interestingly, thioperamide treatment prevented the decline in the number of spinophilin-immunoreactive puncta in mutant HdhQ7/Q111 mice. Similar data was obtained when the layers of the motor cerebral cortex (M1) were analyzed. A significant reduction in the density of spinophilin-immunoreactive puncta in layer I and layer II-III, but not layer V, of the motor cortex of 6-mo-old saline-treated HdhQ7/Q111 mice was found compared to saline-treated HdhQ7/Q7 mice (**Fig. 5B and Fig. S14A**). Interestingly, thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice exhibited a complete recovery in the density of spinophilin-immunoreactive puncta (**Fig. 5A, 5B and Fig. S14A**). No significant differences were found between groups when the mean size of spinophilin puncta was analyzed (**Fig. S14A**). Altogether, these data demonstrate that the loss of spinophilin immunoreactive-puncta in mutant HdhQ7/Q111 mice can be ameliorated by thioperamide treatment.

We also evaluated mutant huntingtin (mhtt) aggregates in the striatum, cerebral cortex and hippocampus of mutant HdhQ7/Q111 mice after saline or thioperamide treatment, as another pathological hallmark of HD (*43, 63, 64*). 1C2 immunostaining revealed in lysates from either vehicle-treated mutant HdhQ7/Q111 mice a substantial accumulation of mhtt oligomeric forms detected as a diffuse smear in the stacking gel (**Fig. S14B**). Thioperamide treatment failed to prevent the accumulation of these oligomeric forms **(Fig. 5C and Fig. S14B)**. No significant differences between groups were found when soluble monomeric mhtt levels were analyzed **(Fig. 5C and Fig. S14B)**.

Thioperamide treatment does not rescue memory and motor learning deficits in HdhQ7/Q111 mice when D1R-H3R heteromers are lost

If the behavioral improvements observed after thioperamide treatment are mediated by the D1R-H3R heteromer and not just by the blockade of the single H3R, then a treatment paradigm in the absence of the heteromer should have no effect. To test this hypothesis, we used wild-type HdhQ7/Q7 and mutant HdhQ7/Q111 mice at the age of 7 months, when we found the heteromer to be lost. Animals were chronically treated with saline or thioperamide for 1 month and motor learning was evaluated using the accelerating rotarod task. As expected, saline-HdhQ7/Q111 mice exhibited poor performance in this task showing shorter latency to fall compared to wild-type HdhQ7/Q7 mice **(Fig. 6A)**. Notably, thioperamide treatment had no effect on motor learning performance as both saline- and thioperamide-treated mutant HdhQ7/Q111 mice were indistinguishable demonstrated by similar latency to fall in the accelerating rotarod task **(Fig. 6A)**.

We next asked whether thioperamide treatment could improve cognitive function by rescuing memory deficits in these same animals. Saline-treated 8-mo-old HdhQ7/Q111 mice exhibited long-term memory deficits when recognition memory was analyzed using the novel object recognition test (NORT) **(Fig. 6B)**. Similar to motor learning results, chronic treatment with thioperamide did not rescue HdhQ7/Q111 mice from memory deficits **(Fig. 6B)**. Overall, these results demonstrate that the effect of thioperamide in learning and memory in HdhQ7/Q111 mice requires the proper expression and function of D1R-H3R heteromers.

D1R-H3R heteromer expression changes occur in other rodent HD models and in HD patients

The fact that thioperamide treatment 1) prevents cognitive and motor learning deficits, 2) ameliorates striatal neuropathology, 3) ameliorates morphological alterations and 4) prevents the loss of D1R-H3R heteromers at 6 mo and 8 mo of age in a mouse model of HD is suggestive that thioperamide, or a future pharmacologically improved H3R antagonist specifically targeting D1R-H3R heteromers, can be used to treat HD symptoms. To test this, we investigated D1R-H3R heteromer expression in other transgenic HD mouse models and in human caudate-putamen slices using PLA. The loss of heteromer expression compared with wild-type littermates was also observed in other mouse models of HD, the R6/1 and R6/2 mice transgenic for the human huntingtin exon 1 **(Fig. S15A and B, respectively)**. Importantly, D1R-H3R heteromers were detected as green spots surrounding the blue stained nuclei in human caudate-putamen slices from control individuals and low-grade (grade 0, 1 and 2) HD patients **(Fig. 7A and B)**. In contrast, green spots were almost absent in samples from high-grade (grade 3 or grade 4) HD patients **(Fig. 7A and B)**. These results show that D1R-H3R heteromer formation changes during disease progression and, importantly, that humans express D1R-H3R heteromers at early disease stages.

Discussion

The imbalance of dopamine inputs throughout HD progression represents a potential "point of no return" for HD patients as this disequilibrium can eventually lead to substantial neuronal dysfunction and cell death. In the present study we demonstrate that 1) excess dopamine signaling via D1R leads to cell death by activating the p38 pathway; 2) D1R-H3R complexes are found within the striatum, cortex and hippocampus of WT mice and in HD mice at early but not late disease stages; 3) targeting D1R via D1R-H3R complexes can slow progression of the disease in early but not late stages when the complexes are lost; and 4) D1R-H3R complexes are expressed in the human brain and thus represent potential therapeutic targets. This is the first demonstration of GPCR heteromers as potential targets to treat HD. Together, these data support a novel role for D1R-H3R complexes in neuroprotection and HD.

Several studies have revealed that dopamine neurotoxicity increases the sensitivity of MSSNs to glutamate inputs and leads to striatal neurodegeneration, a role ascribed to aberrant D1R and not D2R (*10, 14, 65, 66*). Thus, pharmacological treatments aimed to reduce D1R signaling may be beneficial to prevent or slow striatal cell death. Although we cannot rule out the participation of D2R in striatal degeneration, our results suggest that D1R is a major executor of the final signaling cascades that lead to cell death in HD. This is further supported by the fact that D1R is in excess over D2R in the striatum, so it is plausible that the former will be more significantly activated than the latter at increased DA levels. We have demonstrated that a toxic but not sub-toxic concentration of SKF81297 increases cytosolic calcium levels and activates the p38 pro-apoptotic pathway. Accordingly, p38 inhibitors completely abrogated the cell death induced by SKF81297 treatment, supporting the benefits of modulation of D1R signaling as potential treatment in HD. However, direct manipulation of DA production and/or D1R signalling via a specific antagonist has limited therapeutic ability due to associated deleterious side effects. An alternative approach is to modify D1R signalling via the histamine neuromodulator. An interaction between H3R and the dopaminergic system has been previously reported by us and others (*67-69*). In this frame, we have demonstrated that H3R ligands completely abrogate striatal cell death induced by D1R, likely by inhibition of D1R-mediated calcium influx and p38 activation. Importantly, D1R-H3R complexes were found in the striatum, cortex and hippocampus from wild-type HdhQ7/Q7 and mutant HdhQ7/Q111 mice, regions known to be affected by mutant huntingtin toxicity (*2, 70, 71*).

The mechanisms of action of D1R-H3R heteromers can be multiple including allosteric effects. Indeed, the efficacy of the disrupting peptides supports protein-protein-driven effects. A second and potentially additional mechanism is that heteromer formation may alter the trafficking of D1R, which could have pleiotropic consequences on signaling. The signaling effects we see appears to be on a variety of concentrations and timescales in agreement with previous studies showing that GPCR signaling occurs with varied kinetics (*72, 73*). Indeed, part of the concern of trying to target GPCR heteromers for therapeutic purposes is the uncertainty around their stability and thus indirectly whether they can impact GPCR signaling at every timescale. For the case of D1R-H3R heteromers, it appears that they are stable enough that they can affect both rapid receptor signaling (e.g., Ca2+ mobilization) and longer cell signaling pathways like p38, two events that have been involved in neuronal cell death in HD (*74-78*).

Our findings do not rule out that H3R ligands by targeting D2R-H3R heteromers (*79*) could block D2R signaling and contribute to cell death protection. However, several findings argue in favor of D1R-H3R heteromer as uniquely responsible for the effects of thioperamide on cell death reduction. First, D1R over-activation induces cell death-related pathways and D1R internalization and D1R-H3R disruption. In addition, pre-treatment with H3R ligands can block D1R-induced cell death and prevent D1R-H3R loss. Finally, the effect of TAT-peptide analogues of D1R transmembrane domains in D1R-H3R stability and function demonstrate that we are observing specific D1R-H3R, and not D2R-H3R, signaling and function.

Besides striatal and cortical cell death, growing evidence points to neuronal dysfunction as responsible for the earliest HD disturbances in cognitive and behavioral changes (*6, 80*). Despite these early changes, no effective treatments are currently available to treat cognitive decline in HD. Moreover, the timing of intervention is also critical, since atrophy and dysfunction progress with age and treatment may be different according to the stage of illness. In this scenario, and given the well-known role of both dopamine and histamine in synaptic plasticity and memory (*81-89*), it is possible that the therapeutic potential of H3R ligands as modulators of D1R-H3R heteromers could also be extended to improve learning impairments and cognitive decline in HD. This is supported by our data showing that chronic treatment with the H3R antagonist thioperamide at 5 months of age prevented motor learning deficits, as well as impaired spatial and recognition memories in mutant HdhQ7/Q111 mice. Importantly, thioperamide treatment does not induce

off-target effects (such as alterations in spontaneous locomotor activity or anxiety-like behaviors) neither in wild-type HdhQ7/Q7 nor in mutant HdhQ7/Q111 mice. In addition, early chronic treatment with thioperamide prevented disruption of the heteromer at 6 and 8 months of age and the subsequent cognitive decline. It seems unlikely that there is a direct link between D1R-H3R heteromers and cognitive deficits, but the data do suggest that whatever neuronal changes occur during progression of the disease they are blocked or at minimum delayed. Importantly, we can say that D1R-H3R heteromers are required for this effect as thioperamide treatment at 7 months of age (when the heteromer is lost in HD mice) is not able to prevent cognitive and motor learning deficits.

What disease-driven neuronal changes are prevented by H3R antagonism through the D1R-H3R heteromer is not completely clear. However, we did find that chronic thioperamide treatment at early stages completely rescue the reduction in the density of spinophilin-immunoreactive puncta in HD mice in both hippocampal and cortical areas, suggesting that adequate dopaminergic signaling is required for normal forms of synaptic structural plasticity and cognitive processes. Substantial data support the importance of dopamine receptors for synaptic plasticity in the cortex and hippocampus (*90-92*). In this view, any dopamine imbalance with both suboptimal and supra-optimal dopamine activity has been reported to modify cognitive performance (*93, 94*). As the early stages of HD may reflect a hyperdopaminergic stage (*7, 95*), treatments reducing dopamine signaling may have therapeutic benefits. In fact, dopamine-depleting drugs such as tetrabenazine or dopamine-stabilizers as pridopidine showed neuroprotective effects in HD mice (*96*), and improve motor coordination abnormalities in HD patients (*12, 97*), while specific D1R inhibition rescues electrophysiological changes in excitatory and inhibitory synaptic transmission in full-length HD mouse models (*18*). However, none of these treatments have demonstrated cognitive improvements. The suggestion that D1R-H3R heteromers may be legitimate targets for the treatment of HD shines a spotlight on

what continues to be an elusive drug target. Indeed, in the context of this study, the loss of the heteromer in disease progression despite the fact that the receptors themselves are still expressed and functional points to the heteromers as optimal targets rather than the single receptors. The concept of heteromers have been known for over a decade but physiologic examples have only recently come to be appreciated (*36, 37, 98-103*). In sum, our study showing that H3R antagonists can prevent learning and memory deficits by blocking D1R in D1R-H3R complexes, along with the role of these heteromers on neuronal cell death, predict a critical role of the histaminergic system as modulator of the dopamine imbalance in HD, and may help to overcome the deleterious effects of directly manipulating DA-production and/or signaling, thus opening new and important alternatives for HD therapeutics.

References

1. HDCRG, *Cell* **72**, 971 (1993).

2. J. P. Vonsattel, M. DiFiglia, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 369 (1998).

3. R. J. Ferrante, N. W. Kowall, E. P. Richardson, Jr., *J. Neurosci.* **11**, 3877 (1991).

4. J. P. Vonsattel *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559 (1985).

5. A. D. Lawrence, L. H. Watkins, B. J. Sahakian, J. R. Hodges, T. W. Robbins, *Brain* **123 (Pt 7)**, 1349 (2000).

6. J. Lemiere, M. Decruyenaere, G. Evers-Kiebooms, E. Vandenbussche, R. Dom, *J. Neurol.* **251**, 935 (2004).

7. J. Y. Chen, E. A. Wang, C. Cepeda, M. S. Levine, *Front Neurosci.* **7**, 114 (2013).

8. R. J. Jakel, W. F. Maragos, *Trends Neurosci.* **23**, 239 (2000).

9. C. Garret *et al.*, *C. R. Acad. Sci. III* **314**, 199 (1992).

10. P. Paoletti *et al.*, *J. Neurosci.* **28**, 10090 (2008).

11. C. A. Ross, S. J. Tabrizi, *Lancet Neurol.* **10**, 83 (2011).

12. *Neurology* **66**, 366 (2006).

13. T. Mestre, J. Ferreira, M. M. Coelho, M. Rosa, C. Sampaio, *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD006456 (2009).

14. T. S. Tang, X. Chen, J. Liu, I. Bezprozvanny, *J. Neurosci.* **27**, 7899 (2007).

15. C. Cepeda *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* **27**, 671 (2008).

16. A. C. Kreitzer, R. C. Malenka, *Nature* **445**, 643 (2007).

17. V. M. Andre, Y. E. Fisher, M. S. Levine, *Front Syst. Neurosci.* **5**, 46 (2011).

18. V. M. Andre *et al.*, *J. Neurosci.* **31**, 1170 (2011).

19. J. M. Beaulieu, R. R. Gainetdinov, *Pharmacol. Rev.* **63**, 182 (2011).

20. L. Gimenez-Llort, E. Martinez, S. Ferre, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **56**, 549 (1997).

21. S. Frank *et al.*, *Clin. Neuropharmacol.* **31**, 127 (2008).

22. P. Panula, S. Nuutinen, *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 472 (2013).

23. C. Pillot *et al.*, *Neuroscience* **114**, 173 (2002).

24. J. H. Ryu, K. Yanai, R. Iwata, T. Ido, T. Watanabe, *Neuroreport* **5**, 621 (1994).

25. J. H. Ryu, K. Yanai, T. Watanabe, *Neurosci. Lett.* **178**, 19 (1994).

26. E. Moreno *et al.*, *J. Biol. Chem.* **286**, 5846 (2011).

27. E. Sanchez-Lemus, J. A. Arias-Montano, *Neurosci. Lett.* **364**, 179 (2004).

28. S. Gines, P. Paoletti, J. Alberch, *J. Biol. Chem.* **285**, 21537 (2010).

29. C. Ferrada *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* **157**, 64 (2009).

30. E. Moreno *et al.*, *J. Neurosci.* **34**, 3545 (2014).

31. L. Chen, J. D. Bohanick, M. Nishihara, J. K. Seamans, C. R. Yang, *J. Neurophysiol.* **97**, 2448 (2007).

32. P. A. Jose *et al.*, *Hypertens. Res.* **18 Suppl 1**, S39 (1995).

33. X. Guitart *et al.*, *Mol. Pharmacol.* **86**, 417 (2014).

34. A. Hasbi *et al.*, *FASEB J.* **28**, 4806 (2014).

35. L. T. Lee *et al.*, *FASEB J.* **28**, 2632 (2014).

36. J. Bonaventura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **112**, E3609 (2015).

37. X. Vinals *et al.*, *PLoS. Biol.* **13**, e1002194 (2015).

38. M. M. Semenova *et al.*, *Nat. Neurosci.* **10**, 436 (2007).

39. S. J. Kotowski, F. W. Hopf, T. Seif, A. Bonci, Z. M. von, *Neuron* **71**, 278 (2011).

40. M. A. Ariano *et al.*, *J. Neurosci. Res.* **68**, 716 (2002).

41. M. J. Lohse, D. Calebiro, *Nature* **495**, 457 (2013).

42. S. N. Roed *et al.*, *J. Biol. Chem.* **290**, 1233 (2015).

43. A. Giralt *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1203 (2012).

44. M. Puigdellivol *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* (2015).

45. V. Brito *et al.*, *J. Clin. Invest* **124**, 4411 (2014).

46. R. J. Ferrante, N. W. Kowall, E. P. Richardson, Jr., *J. Neurosci.* **11**, 3877 (1991).

47. P. Guidetti *et al.*, *Exp. Neurol.* **169**, 340 (2001).

48. G. Lynch *et al.*, *J. Neurosci.* **27**, 4424 (2007).

49. A. J. Milnerwood *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1690 (2006).

50. D. A. Simmons *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 4906 (2009).

51. A. Sotrel, R. S. Williams, W. E. Kaufmann, R. H. Myers, *Neurology* **43**, 2088 (1993).

52. T. L. Spires *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2799 (2004).

53. J. Hao *et al.*, *J. Comp Neurol.* **465**, 540 (2003).

54. Y. Tang *et al.*, *Cereb. Cortex* **14**, 215 (2004).

55. J. A. Bibb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6809 (2000).

56. V. Brito *et al.*, *Cell Death. Dis.* **4**, e595 (2013).

57. J. H. Cha *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **354**, 981 (1999).

58. M. Glass, M. Dragunow, R. L. Faull, *Neuroscience* **97**, 505 (2000).

59. A. L. Hebb, H. A. Robertson, E. M. Denovan-Wright, *Neuroscience* **123**, 967 (2004).

60. F. Niccolini *et al.*, *Brain* **138**, 3016 (2015).

61. D. A. Van *et al.*, *Neuroreport* **11**, 3751 (2000).

62. I. Villar-Menendez *et al.*, *Neuromolecular. Med.* **15**, 295 (2013).

63. M. Arrasate, S. Finkbeiner, *Exp. Neurol.* **238**, 1 (2012).

64. G. Hoffner, S. Soues, P. Djian, *Prion.* **1**, 26 (2007).

65. C. Cepeda, M. S. Levine, *Dev. Neurosci.* **20**, 1 (1998).

66. J. Flores-Hernandez *et al.*, *J. Neurophysiol.* **88**, 3010 (2002).

67. V. J. Kononoff, S. Nuutinen, M. Tuominen, P. Panula, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **357**, 264 (2016).

68. M. Rapanelli *et al.*, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **24**, 1896 (2014).

69. M. Rapanelli *et al.*, *J. Biol. Chem.* **291**, 21042 (2016).

70. A. Reiner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 5733 (1988).

71. H. D. Rosas *et al.*, *Neurology* **60**, 1615 (2003).

72. D. Calebiro, V. O. Nikolaev, M. J. Lohse, *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 1 (2010).

73. D. Calebiro, V. O. Nikolaev, L. Persani, M. J. Lohse, *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 221 (2010).

74. A. Dau, C. M. Gladding, M. D. Sepers, L. A. Raymond, *Neurobiol. Dis.* **62**, 533 (2014).

75. J. Fan *et al.*, *Neurobiol. Dis.* **45**, 999 (2012).

76. M. Muller, B. R. Leavitt, *J. Neurochem.* **130**, 328 (2014).

77. D. M. Taylor *et al.*, *J. Neurosci.* **33**, 2313 (2013).

78. J. Q. Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.* **288**, 3070 (2013).

79. C. Ferrada *et al.*, *Neuropharmacology* **55**, 190 (2008).

80. M. Puigdellivol, A. Saavedra, E. Perez-Navarro, *Brain Pathol.* **26**, 752 (2016).

81. E. Cahill *et al.*, *Mol. Psychiatry* **19**, 1295 (2014).

82. T. J. Ellender, I. Huerta-Ocampo, K. Deisseroth, M. Capogna, J. P. Bolam, *J. Neurosci.* **31**, 15340 (2011).

83. H. L. Haas, O. A. Sergeeva, O. Selbach, *Physiol Rev.* **88**, 1183 (2008).

84. V. A. Komater *et al.*, *Behav. Brain Res.* **159**, 295 (2005).

85. M. R. Lopez de, R. Sanchez-Pernaute, *CNS. Neurol. Disord. Drug Targets.* **9**, 601 (2010).

86. A. Mohsen *et al.*, *Neuropharmacology* **81**, 188 (2014).

87. M. Orsetti, C. Ferretti, R. Gamalero, P. Ghi, *Psychopharmacology (Berl)* **159**, 133 (2002).

88. V. Pascoli, C. Boer-Saccomani, J. F. Hermant, *Psychopharmacology (Berl)* **202**, 141 (2009).

89. V. Wieschollleck, D. Manahan-Vaughan, *Hippocampus* **24**, 1615 (2014).

90. R. Levy, P. S. Goldman-Rakic, *Exp. Brain Res.* **133**, 23 (2000).

91. T. W. Robbins, *Prog. Brain Res.* **126**, 469 (2000).

92. S. Sajikumar, J. U. Frey, *Neurobiol. Learn. Mem.* **82**, 12 (2004).

93. V. S. Mattay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 6186 (2003).

94. S. Vijayraghavan, M. Wang, S. G. Birnbaum, G. V. Williams, A. F. Arnsten, *Nat. Neurosci.* **10**, 376 (2007).

95. F. Mochel, B. Durant, A. Durr, R. Schiffmann, *PLoS. One.* **6**, e18336 (2011).

96. H. Wang, X. Chen, Y. Li, T. S. Tang, I. Bezprozvanny, *Mol. Neurodegener.* **5**, 18 (2010).

97. J. G. de Yebenes *et al.*, *Lancet Neurol.* **10**, 1049 (2011).

98. K. Baba *et al.*, *Sci. Signal.* **6**, ra89 (2013).

99. M. Fribourg *et al.*, *Cell* **147**, 1011 (2011).

100. S. Gonzalez *et al.*, *PLoS. Biol.* **10**, e1001347 (2012).

101. S. Gonzalez *et al.*, *Mol. Psychiatry* **17**, 650 (2012).

102. A. Kern, R. Albarran-Zeckler, H. E. Walsh, R. G. Smith, *Neuron* **73**, 317 (2012).

103. G. Navarro *et al.*, *J. Neurosci.* **35**, 6639 (2015).

104. F. Trettel *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2799 (2000).

105. A. Lloret *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2015 (2006).

106. L. Mangiarini *et al.*, *Cell* **87**, 493 (1996).

107. E. Gracia *et al.*, *Neuropharmacology* **71**, 56 (2013).

108. T. W. Chen *et al.*, *Nature* **499**, 295 (2013).

109. Y. Charlier, C. Brabant, M. E. Serrano, Y. Lamberty, E. Tirelli, *Behav. Brain Res.* **253**, 121 (2013).

Acknowledgements

We are very grateful to Ana Lopez for technical assistance. Dr. Teresa Rodrigo and the staff of the animal care facility (Facultat de Psicologia, Universitat de Barcelona), for their support and advice. This work was supported by grants from Ministerio de Economia y Competitividad (SAF2012-39142 to S.G., SAF2011-29507 to J.A., SAF2012-35759 to M.G., and SAF2011-23813 to E.C.,); Centro de Investigacion Biomédicas en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED CB06/05/0064, CB06/05/0054, CB06/05/0042, and CB06/05/0005); Generalitat de Catalunya, Spain (2014SGR-00968 to J.A. and 2014SGR-1236 to E.C); Grant 20140610 from Fundació La Marató de TV3 to E.C.; RSC Grant Project RG140118, Jerome LeJeune Foundation FJL-01/01/2013, BBSRC BB/N504282/3 and start-up funds from QMUL. We thank Manel Bosch at UB and Paul Thomas at the Henry Welcome Laboratory for Cell Imaging at UEA for their help with the microscopy.

Figure 1

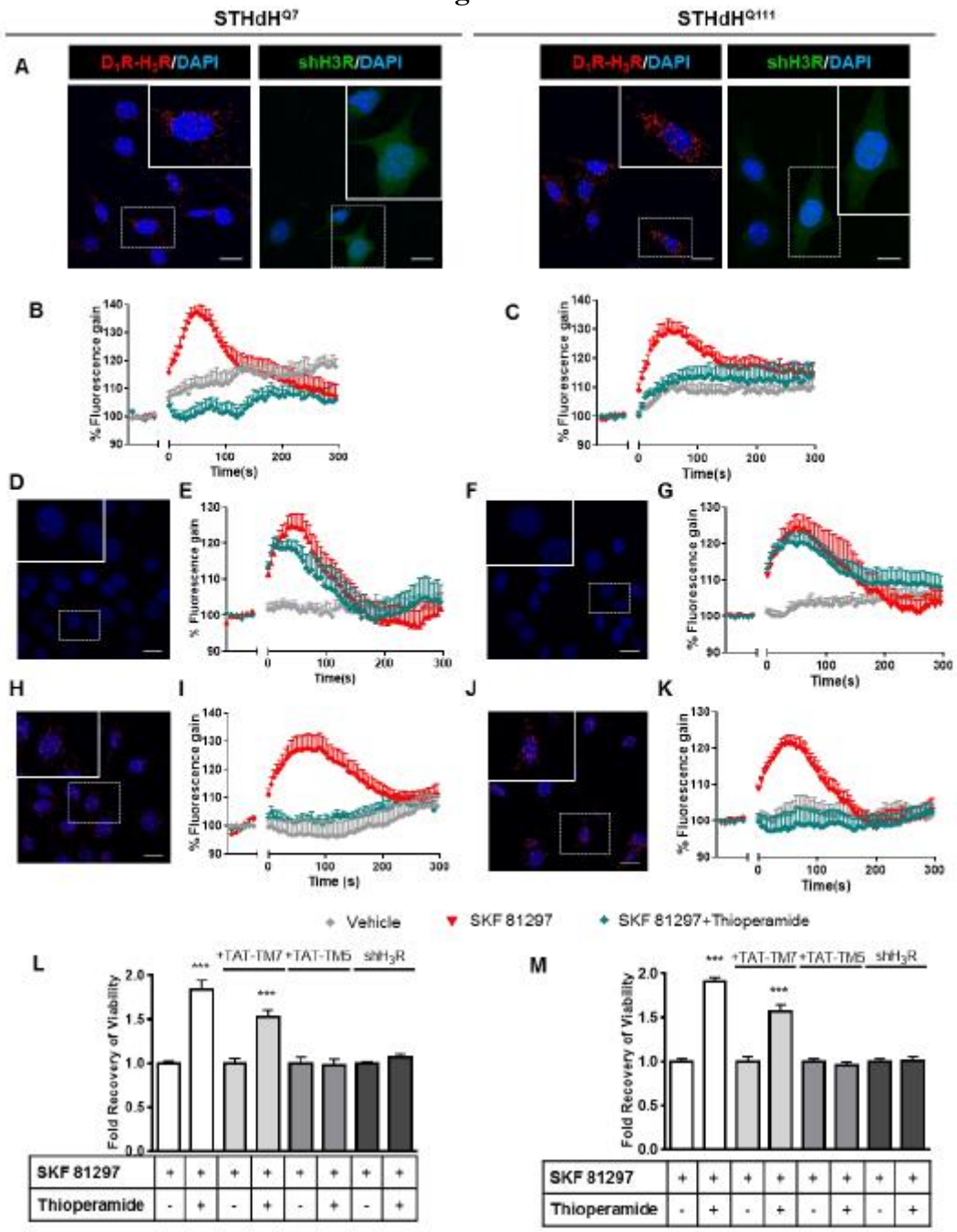


Figure 1. Functional D1R-H3R heteromers are expressed in STHdHQ7 and STHdHQ111 cells. PLA were performed in STHdHQ7 and STHdHQ111 cells (**A, D, F, H and J**) or in cells infected with shH3R to silence H3R, observed as green stained cells due to the GFP expression included in the plasmid (**A**). D1R-H3R heteromers were visualized in STHdH cells as red spots around blue colored DAPI stained nucleus, but not in STHdH cells infected with shH3R vector (**A**). Calcium increases were measured in STHdHQ7 (**B, E and I**) or STHdHQ111 (**C, G and K**). Cells were treated (20 min) or not with the H3R antagonist thioperamide (10 μM) before the addition of vehicle or SKF 81297 (1 μM). In (**D, E, F, G, H, I, J and K**), STHdHQ7 (**D, E, H and I**) or STHdHQ111 (**F, G, J and K**) cells were also pre-treated for 60 min with 4 μM TM5 (**D, E, F and G**) or TM7 (**H, I, J and K**) peptides. Heteromers were visualized as red spots around DAPI (blue) stained nucleus in cells pre-treated with TM7 peptide. Scale: 20 μm. For each calcium curve values are expressed as a percentage increase with respect to untreated cells and are a mean ± SEM of 3 to 5 independent experiments. In (**L** and **M**), cell viability was determined in STHdHQ7 (**L**) or STHdHQ111 cells (**M**) pre-treated for 60 min with vehicle (white columns), with 4 μM TAT-TM7 (pale grey columns) or TAT-TM5 (grey columns) or infected with shH3R to silence H3R (dark grey columns) prior overstimulation with 30 μM SKF 81297. Values represent mean ± SEM (n = 24 to 30) of cell viability recovery expressed as in-fold respect to SKF 81297 treated cells. Student's t test showed a significant (***$p < 0.001$) effect over SKF 81297 treated cells.

Figure 2

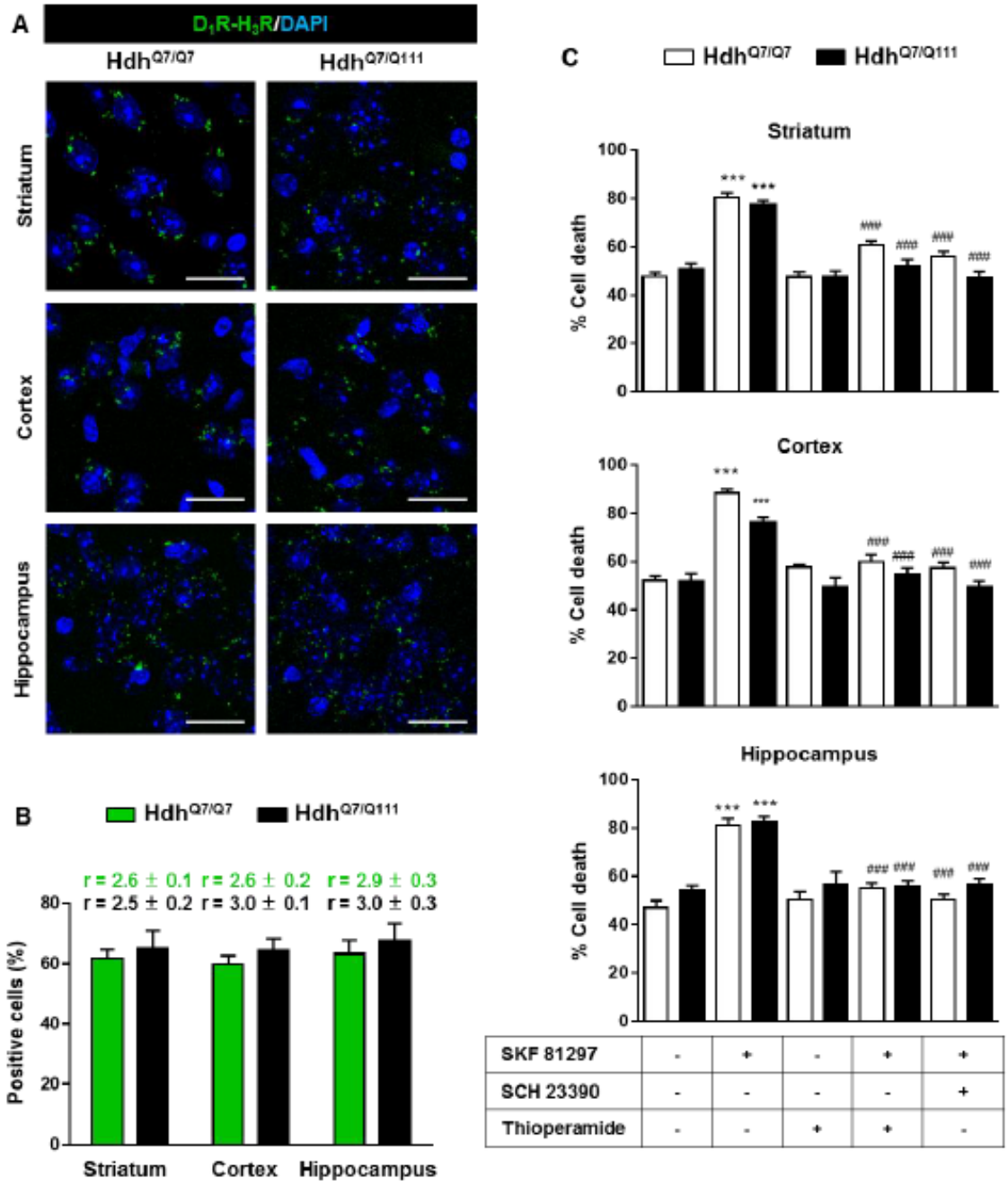


Figure 2. Functional D1R-H3R heteromers are expressed in wild-type HdhQ7/Q7 and mutant HdhQ7/Q111 mice. Striatal, cortical or hippocampal slices from 4-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were used. In (**A**), by Proximity Ligation Assays (PLA) D1R-H3R heteromers were visualized in all slices as green spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μm. In (**B**), the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 4-8 different fields from 3 different animals. Student's t test showed no significant differences in heteromers expression in HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. In (**C**), striatal, cortical or hippocampal organotypic slice cultures from 4-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were treated for 60 min with vehicle, the D1R antagonist SCH 23390 (10 μM) or H3R antagonist thioperamide (10 μM) before the addition of SKF 81297 (50 μM). After 48h cell death was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3 to 19) of percentage of cell death. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant effect over non-treated organotypic cultures (***$p < 0.001$) or of the H3R antagonist plus SKF 81297 treatment over the SKF 81297 (###$p < 0.001$).

Figure 3

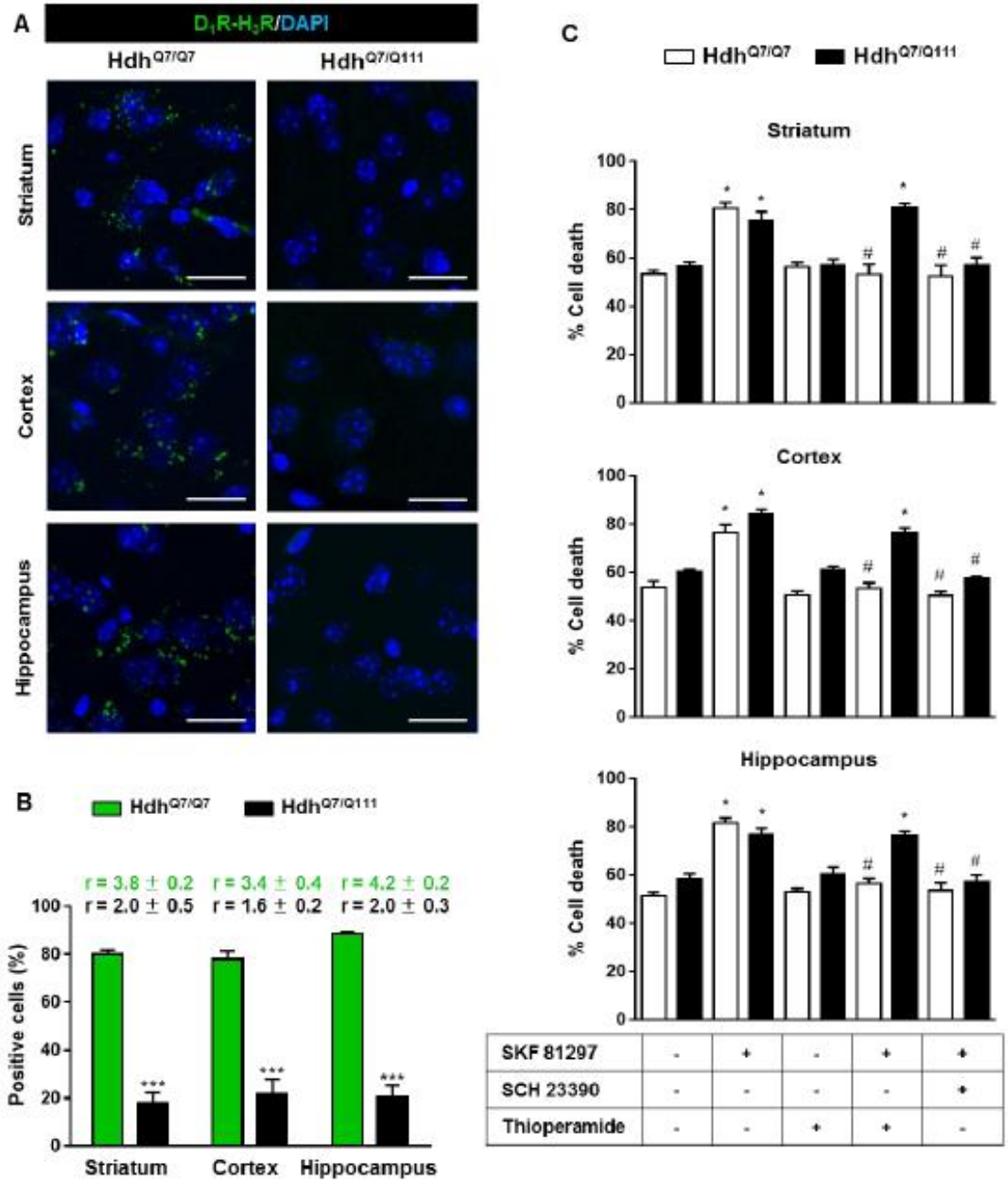


Figure 3. Functional D1R-H3R heteromers are expressed in wild-type HdhQ7/Q7 but not in 8-month-old mutant HdhQ7/Q111 mice. Striatal, cortical or hippocampal slices from 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were used. In (**A**), by Proximity Ligation Assays (PLA) D1R-H3R heteromers were visualized in HdhQ7/Q7 mice but not in HdhQ7/Q111 mice as green spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μm. In (**B**), the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 5-7 different fields from 3 different animals. Student's t test showed a significant (***$p<0.05$) decrease of heteromers expression in HdhQ7/Q111 mice compared to the respective HdhQ7/Q7 mice. In (**C**) striatal, cortical or hippocampal organotypic slice cultures from 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were treated for 60 min with medium, the D1R antagonist SCH 23390 (10 μM) or the H3R antagonist thioperamide (10 μM) before the addition of SKF 81297 (50 μM) and cell death was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3 to 6) of percentage of cell death. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant effect over non-treated organotypic cultures (*$p < 0.05$) or of the H3R antagonist plus SKF 81297 treatment over the SKF 81297 (#$p < 0.05$).

Figure 4

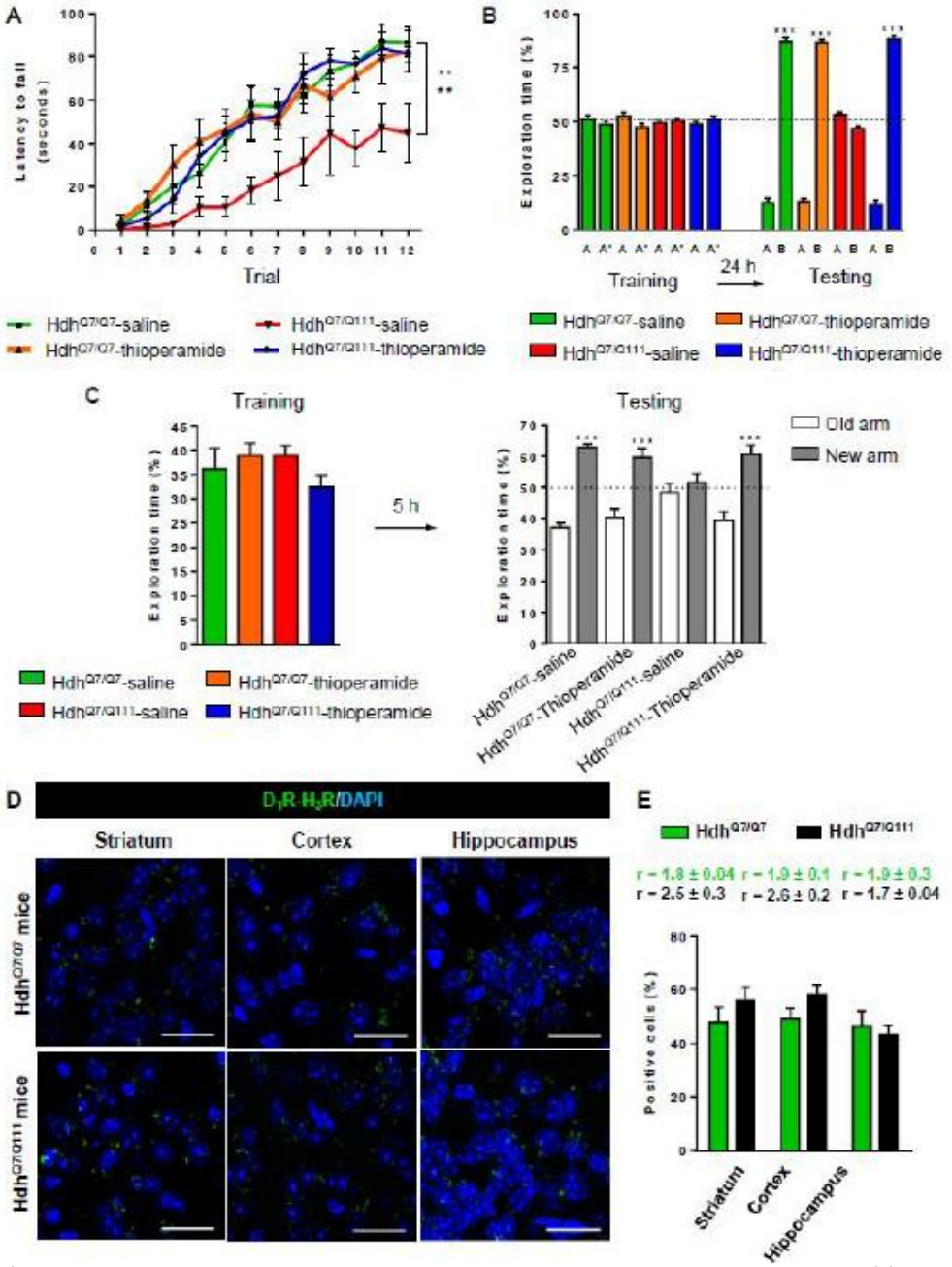


Figure 4. Thioperamide chronic treatment prevents motor learning, long-term memory (LTM) deficits and the loss of receptor heteromerization in 6-month-old HdhQ7/Q111 mice. In (**A**), curves illustrating the latency to fall in the accelerating rotarod of 6-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice treated with saline or thioperamide from 5 months of age are shown. In (**B**), the exploration time for saline or thioperamide-treated HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice during the training and the testing (24 h delay, LTM) sessions in a novel-object recognition task showing that long-term recognition memory deficits are rescued in the thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice. One-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* showed significant differences (***p<0.001) compared to the old object recognition. In (**C**), bar diagram illustrating the exploration time for saline- or thioperamide-treated HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice during the training and the 5 h later testing in the T-SAT showing thioperamide reverses spatial long-term memory (LTM) deficits. In (**a** to **c**), 11 saline-treated HdhQ7/Q7 mice, 10 thioperamide-treated HdhQ7/Q7 mice, 7 saline-treated HdhQ7/Q111 mice and 9 thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice were evaluated at 6 months of age. In (**D**) PLA were performed in striatal, cortical and hippocampal slices from 6-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice treated with thioperamide. D1R-H3R heteromers were visualized in all samples as green spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μm. In (**E**) the right panel, the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 4-8 different fields from 3 different animals. Student's *t* test showed no significant differences in heteromer expression in thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice compared to the respective HdhQ7/Q7 mice.

Figure 5

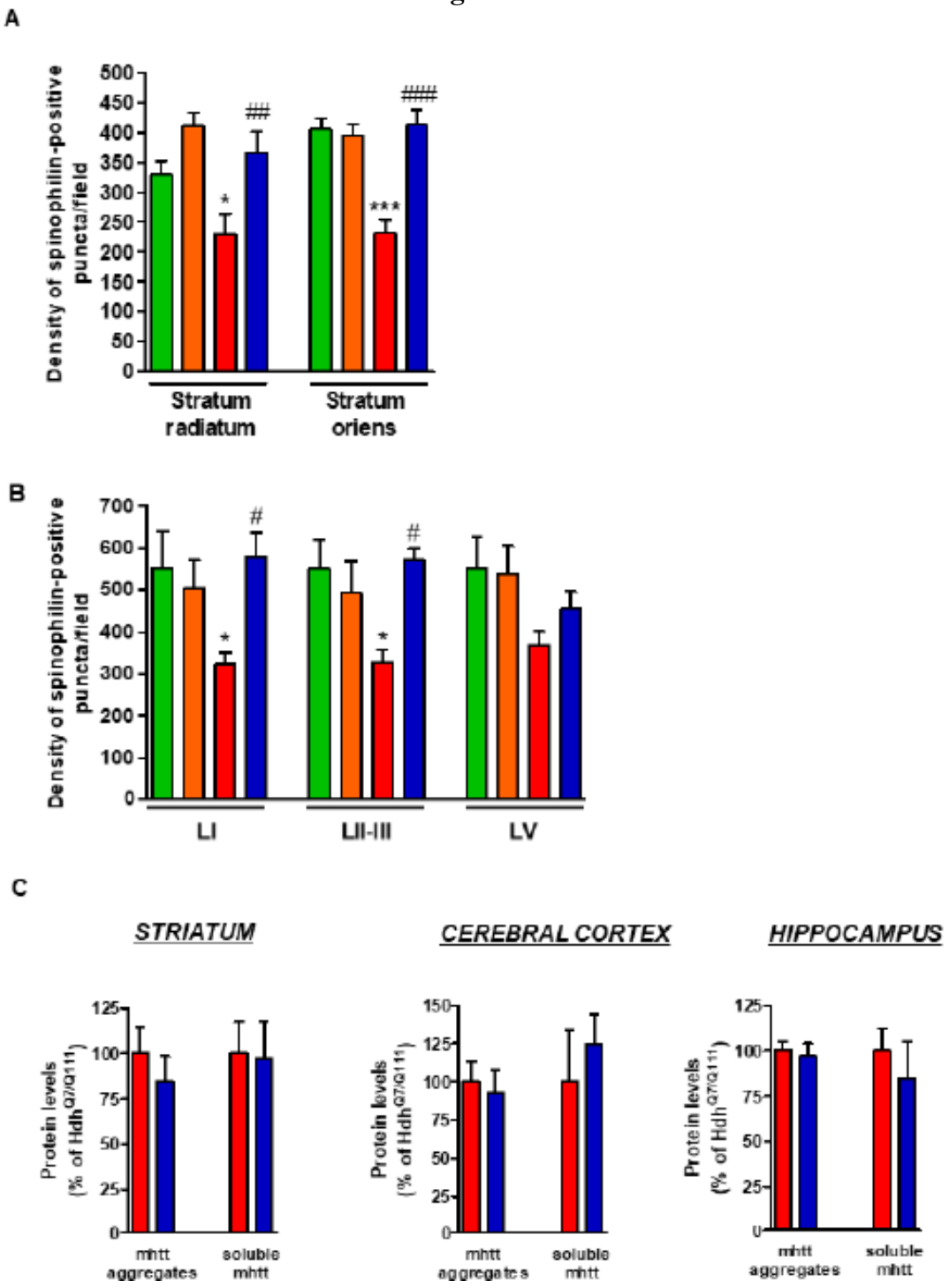


Figure 5. Thioperamide treatment restored spinophilin-immunoreactive puncta reduction in the hippocampus and motor cortex of HdhQ7/Q111 mice and exerts no effect on the clearance of mutant huntingtin accumulation. In (**A**) spinophilin-immunoreactive puncta were counted in the *stratum oriens* and *stratum radiatum* of CA1 hippocampus and in (**B**) layers I, II/III and V of motor cortex area 1 (M1) of saline and thioperamide-treated WT HdhQ7/Q7 and knock-in HdhQ7/Q111 mice. Quantitative analysis is shown as mean ± SEM (n= 9 images from three animals/group). Statistical analysis was performed using Student's two-tailed t test. *p<0.05, ***p<0.001 compared to saline-treated HdhQ7/Q7 mice. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 compared to saline-treated HdhQ7/Q111 mice. In (**C**), Quantification of the protein levels of insoluble mHtt oligomeric forms and soluble mHtt forms of total striatal, hippocampal and cortical extracts from 6-month-old saline and thioperamide-treated knock-in HdhQ7/Q111 mice analysed by immunoblot. All histograms represent the mean ± SEM (n=6-8 per group). Student's *t* test showed no significant differences between groups.

Figure 6

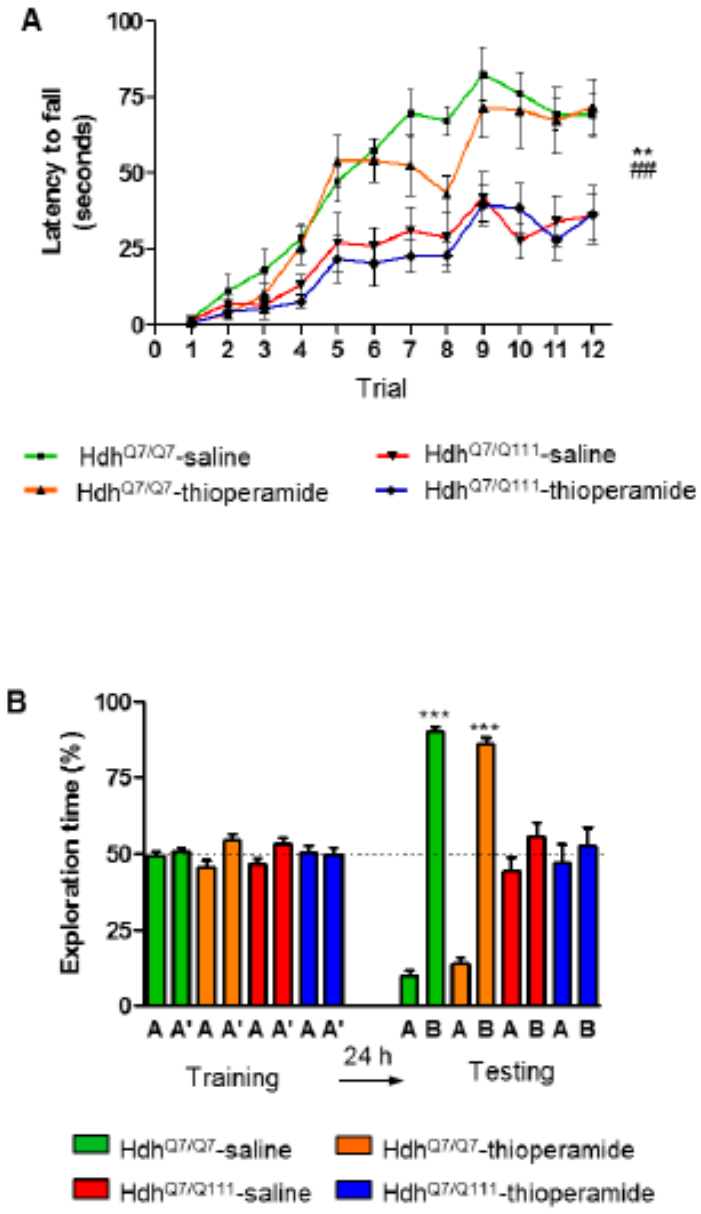


Figure 6. Thioperamide chronic treatment does not prevent motor learning and long-term memory (LTM) deficits in 8-month-old HdhQ7/Q111 mice when the D1R-H3R heteromer is not expressed. In (**A**), curves illustrating the latency to fall in the accelerating rotarod of 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice treated with saline or thioperamide from 7 months of age are shown. Two-way ANOVA with repeated measures showed significant differences (**p<0.01) of saline-treated HdhQ7/Q111 mice compared to saline-treated HdhQ7/Q7 mice or (##p<0.01) thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice compared to saline-treated HdhQ7/Q7 mice. 11 saline-treated HdhQ7/Q7 mice, 11 thioperamide-treated HdhQ7/Q7 mice, 8 saline-treated HdhQ7/Q111 mice and 9 thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice were evaluated at 8 months of age. In (**B**), bar diagram illustrating the exploration time for saline or thioperamide-treated HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice during the training and the testing (24 h delay, LTM) sessions in a novel-object recognition task showing that long-term recognition memory deficits are not rescued in the thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice. One-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons showed significant differences (***p<0.001) compared to the old object recognition. 11 saline-treated HdhQ7/Q7 mice, 12 thioperamide-treated HdhQ7/Q7 mice, 10 saline-treated HdhQ7/Q111 mice and 11 thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice were evaluated at 8 months of age.

Figure 7

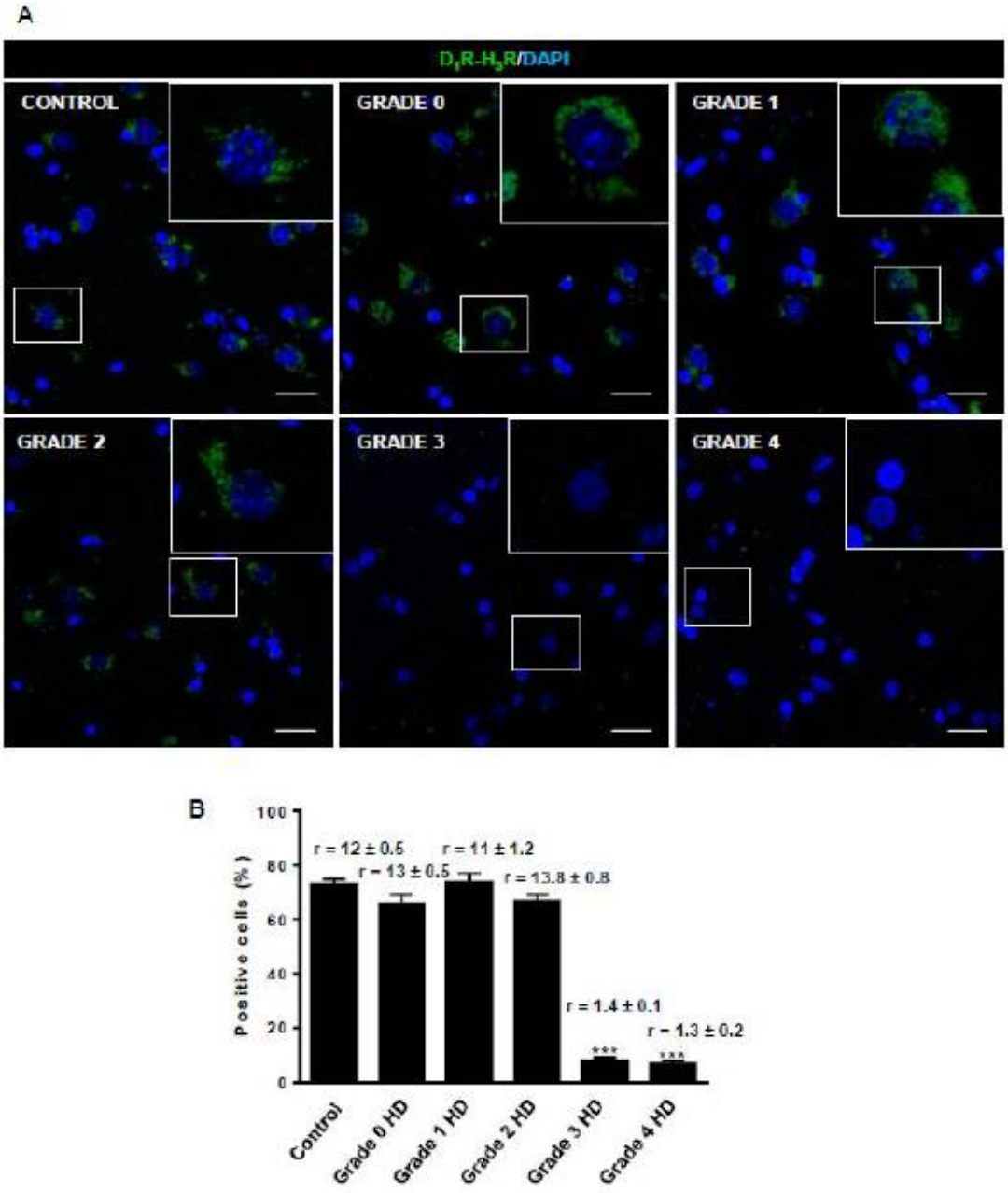


Figure 7. Striatal D1R-H3R heteromers are expressed in human control subjects and grade 2 HD patients but not in grade 3-4 HD patients. In (**A**), by Proximity Ligation Assays (PLA), D1R-H3R heteromers were visualized as green spots around blue colored DAPI stained nucleus in human striatal slices from age matched control subjects and 0-2 grade HD patients but not in 3-4 grade HD patients. Scale bar: 20 μm. In (**B**), the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data are mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 10 different fields from subject described in Materials and Methods. Student's t test showed a significant (***$p<0.001$) decrease of heteromers expression in 3-4 grade HD patients compared to control subjects.

Supplementary Figure 1

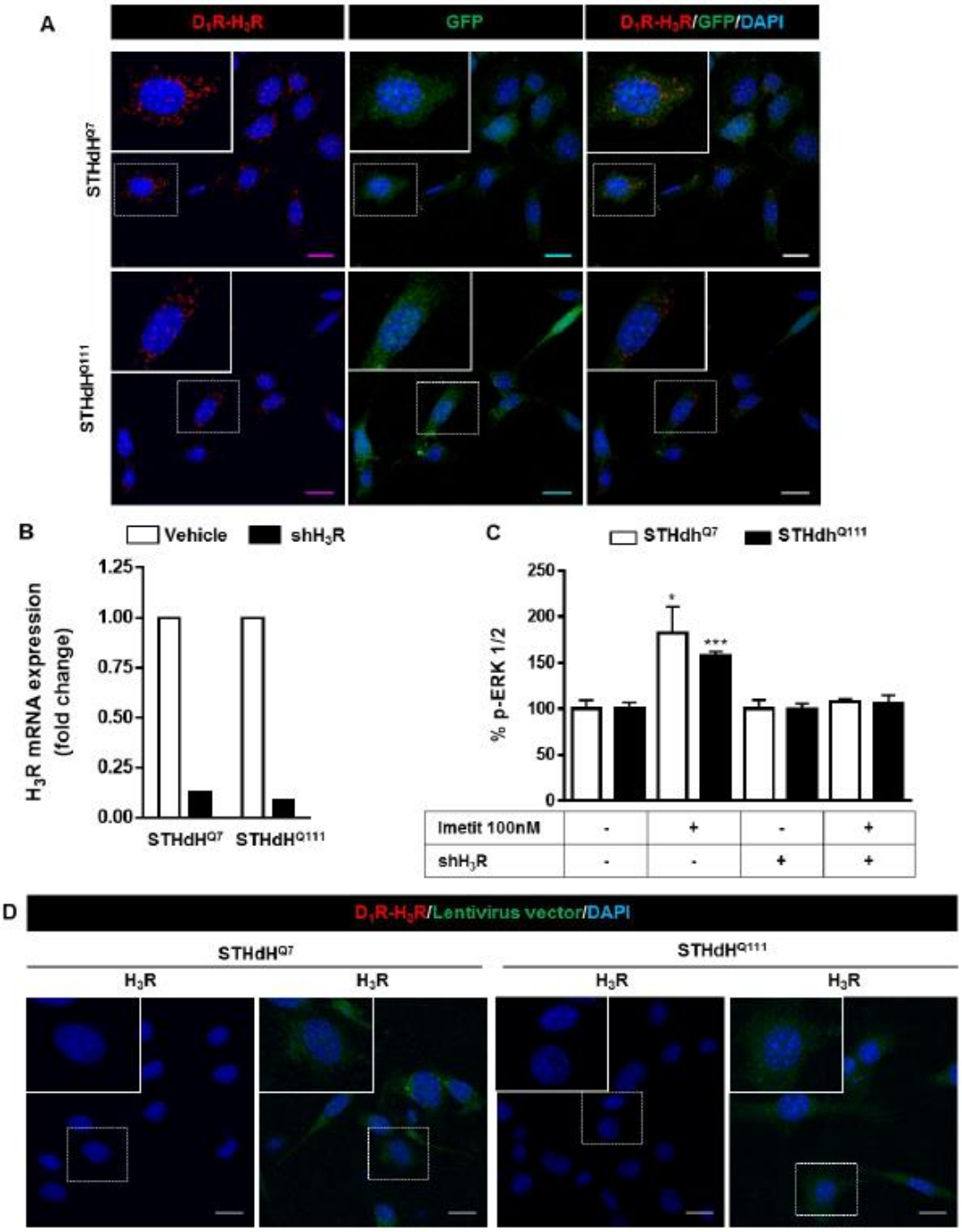


Figure S1. Negative controls for Proximity Ligation Assays (PLA) in striatal cells not depleted or H3R depleted by shRNA. In (**A**), Proximity Ligation Assays (PLA) were performed in STHdHQ7 and STHdHQ111 cells not H3R depleted but infected with GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control plasmid. D1R-H3R heteromers were visualized as red spots around blue colored DAPI stained nucleus (left panels), in infected cells stained in green due to the GFP expression included in the plasmid (middle panel). Merge images are given in the right panels. In (**B**), controls showing that H3R mRNA is not present in cells depleted of H3R by shRNA. STHdHQ7 and STHdHQ111 cells were not infected or infected with lentiviral silencing plasmid GIPZ Human histamine H3 receptor shRNA (shH3R). Values represent fold change respect to non-silencing vector. In (**C**) controls showing the lack of H3R stimulated signaling in cells depleted of H3R by shRNA. STHdHQ7 or STHdHQ111 cells were not stimulated (basal) or stimulated with the H3R agonist imetit (100 nM) and ERK 1/2 phosphorylation was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3) of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated cells. Student's *t* test showed significant differences over basal conditions (*p<0.05, ***p<0.001). In (**D**), PLA were performed in the absence of the D1R primary antibody using STHdHQ7 or STHdHQ111 cells not infected (left panels) or infected (right panels) with GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control plasmid. Scale bar: 20 μm.

Supplementary Figure 2

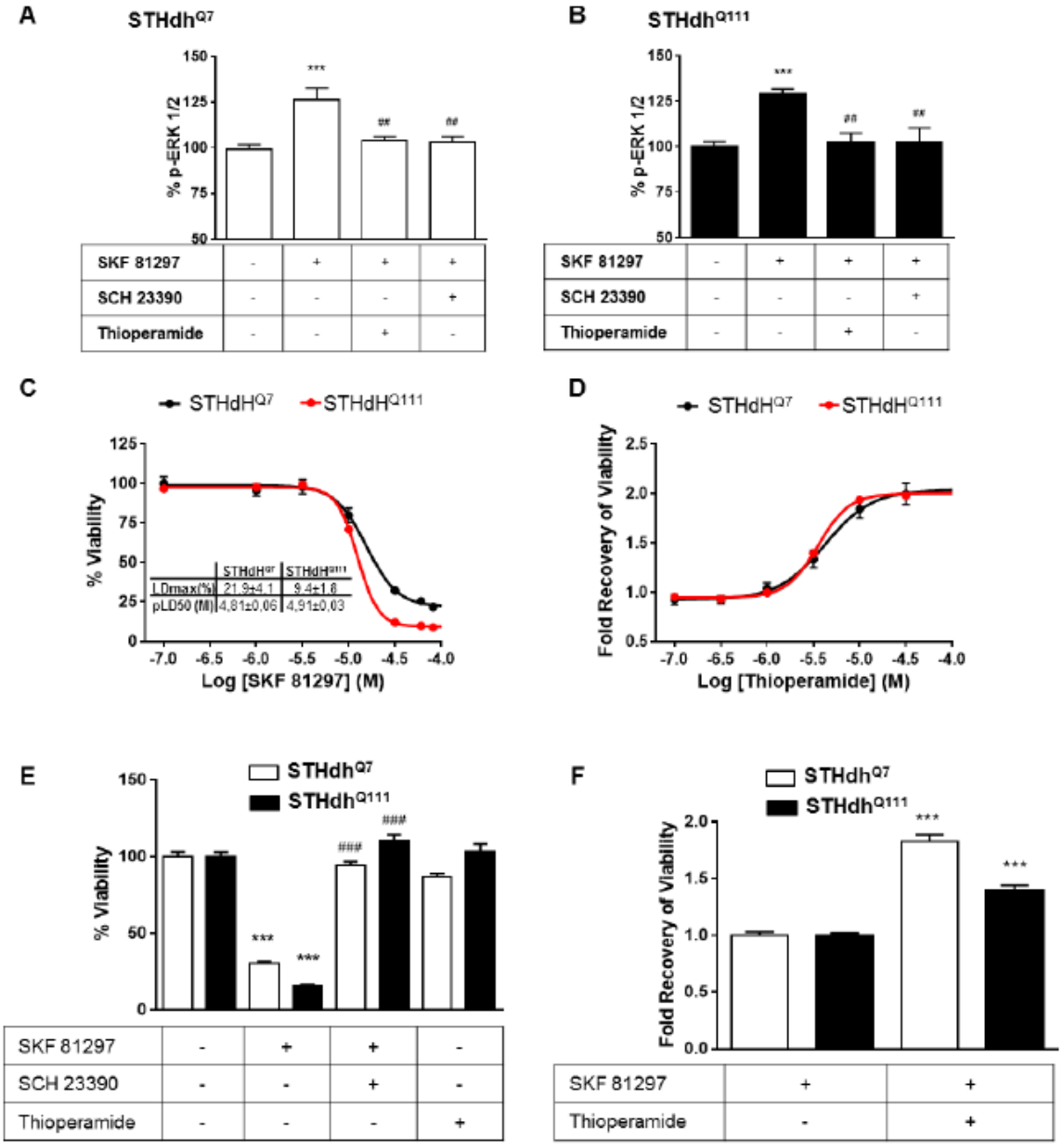


Figure S2. H3R ligands revert the D1R-mediated decreases in STHdHQ7 and STHdHQ111 cell viability. STHdHQ7 (**A**) or STHdHQ111 (**B**) cells were treated for 20 min with vehicle, D1R antagonist SCH 23390 (1 μM) or the H3R antagonist thioperamide (1 μM) before the addition of SKF 81297 (100 nM) for an additional incubation period of 10 min and ERK 1/2 phosphorylation was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3 to 4) of percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated cells (control). One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant effect over basal (***p < 0.001) or over SKF 81297 treatment (##p < 0.01). In (**C, D**), cell viability was determined in STHdHQ7 (black curves) or STHdHQ111 cells (red curves) pre-treated for 60 min with vehicle (**C**), or with the H3R antagonist thioperamide 10 μM (**B**) prior overstimulation with SKF 81297 (increasing concentrations in **A** or 30 μM in **B**). Values represent mean ± SEM (n = 24 to 30) of percentage of viable cells respect to vehicle-treated cells (**C**) or the cell viability recovery expressed as in-fold respect to SKF 81297 treated cells (**D**). In (**E** and **F**) the effect of D1R antagonist, H3R antagonist and silencing vector transfection in striatal cells viability is shown. STHdHQ7 and STHdHQ111 cells were not infected (**E**) or infected (**F**) with GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control plasmid. Cells were pretreated for 60 min with vehicle, 10 μM SCH 23390 or 10 μM thioperamide prior over-stimulation with SKF 81297 (30 μM). Values represent mean ± SEM (n = 7 to 22) of percentage of viable cells respect to vehicle-treated cells (**E**) or the cell viability recovery expressed as in-fold respect to SKF 81297 treated cells (**F**). Student's *t* test showed a significant (***p < 0.001) effect over not treated cells (**E**) or SKF 81297 treated cells (**F**).

Supplementary Figure 3

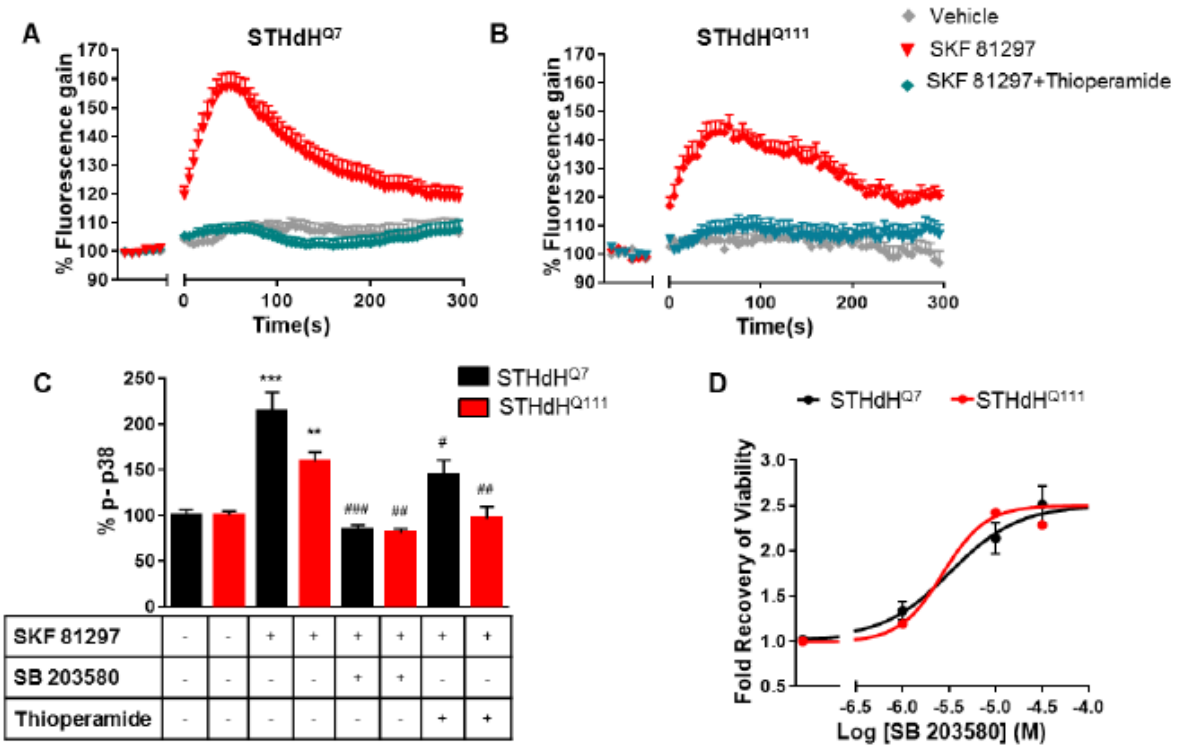


Figure S3. H3R ligands revert the D1R-mediated decreases in cell viability in STHdHQ7 and STHdHQ111 by modulating calcium signaling and p38 phosphorylation. In (**A** and **B**), STHdHQ7 (**A**) or STHdHQ111 (**B**) cells were pre-treated for 20 min with vehicle or with the H3R antagonist thioperamide (10 μM) and were not stimulated or overstimulated with SKF 81297 (30 μM) prior intracellular calcium release determination. For each curve values are expressed as a percentage of increase with respect to untreated not overstimulated cells and are mean ± SEM of 3 to 9 independent experiments. In (**C**), STHdHQ7 or STHdHQ111 cells were treated for 20 min with medium (control), with SB 203580 (10 μM) or with the H3R antagonist thioperamide (10 μM). Cells were overstimulated with SKF 81297 (30 μM) and p38 phosphorylation was determined. Values represent mean ± SEM (n = 3) and are expressed as percentage over control. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant effect over control (**p < 0.01, ***p < 0.001) or over SKF 81297 treatment (#p < 0.05, ##p < 0.01, ###p < 0.001). In (**D**), cell viability was determined in STHdHQ7 (black curves) or STHdHQ111 cells (red curves) pre-treated for 60 min with the p38 inhibitor SB 203580 prior overstimulation with SKF 81297 (30 μM). Values represent mean ± SEM (n = 24 to 30) of the cell viability recovery expressed as in-fold respect to SKF 81297 treated cells (**D**).

Supplementary Figure 4

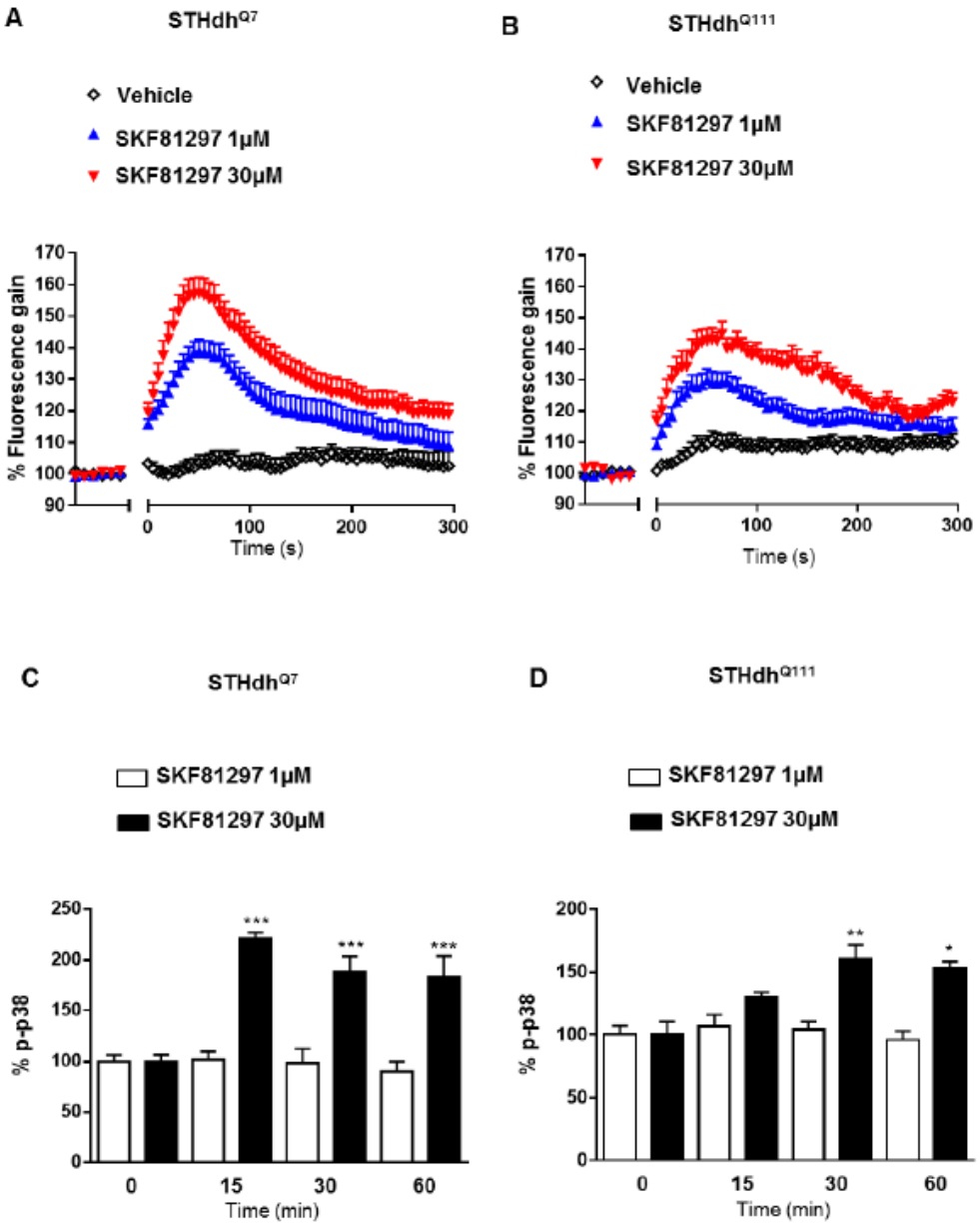


Figure S4. Effect of low and high SKF 81297 concentrations in p-p38 and intracellular calcium release. STHdHQ7 (**A** and **C**) and STHdHQ111 (**B** and **D**) cells were time-dependent stimulated with 1 µM or 30 µM SKF 81297 and intracellular calcium release (**A** and **B**) or p-p38 phosphorylation (**C** and **D**) was determined. In (**A** and **B**), curves are mean ± SEM of 3 to 6 independent experiments. In (**C** and **D**) values represent mean ± SEM of two independent experiments performed per triplicate of percentage of phosphorylation respect to vehicle-treated cells. Student's *t* test showed a significant (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001) effect over not treated cells.

Supplementary Figure 5

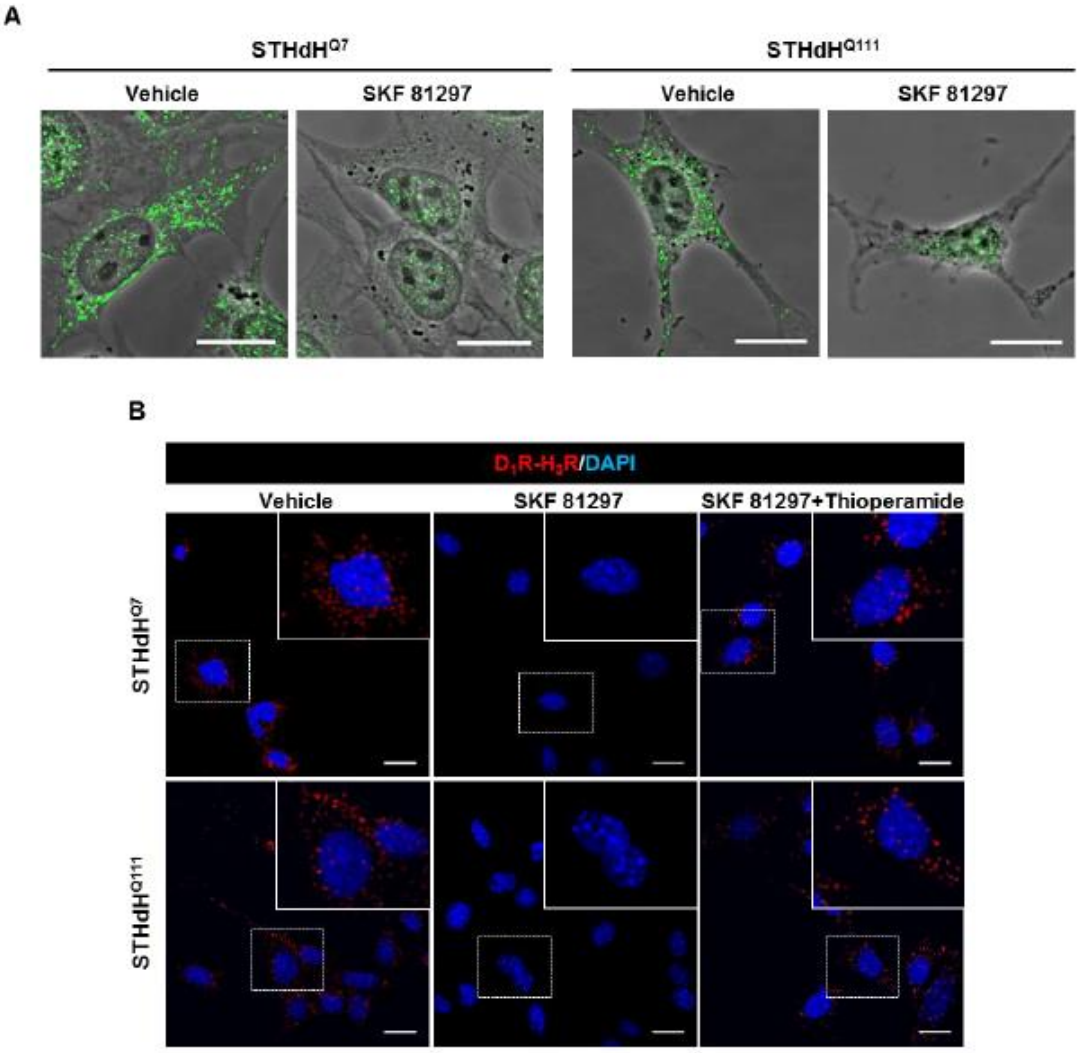


Figure S5. H3R ligands revert the D1R overstimulation-induced heteromer disruption in striatal cells. In (**A**), superposition of phase contrast and confocal microscopy (superimposed Z stacks) images were shown for immunostained D1R (green) in STHdhQ7 and STHdhQ111 cells treated with vehicle (control) or with SKF 81297 (30 μM) for 45 min. In (**B**), Proximity Ligation Assays (PLA) were performed in STHdHQ7 or STHdHQ111 cells pre-treated for 60 min with vehicle or with the H3R antagonist thioperamide (10μM) before addition of medium (in the case of the vehicle control) or SKF 81297 (30 μM, 45 min). D1R-H3R heteromers were visualized as red spots around blue colored DAPI stained nucleus in control and H3R ligands-treated cells, but not in SKF 81297 only treated cells. Scale bar: 20 μm.

Supplementary Figure 6

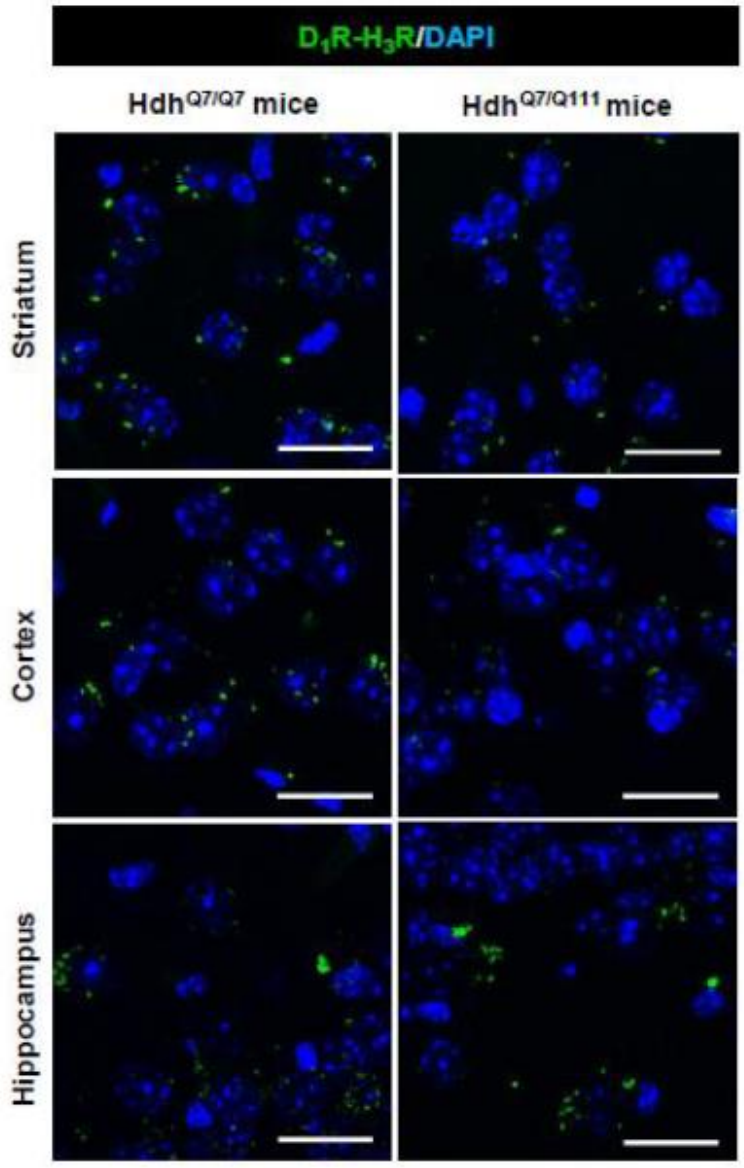


Figure S6. D1R-H3R heteromer are expressed in 2-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. Proximity Ligation Assays (PLA) were performed using striatal, cortical or hippocampal slices from 2-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. D1R-H3R heteromers were visualized in all slices as green spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μm.

Supplementary Figure 7

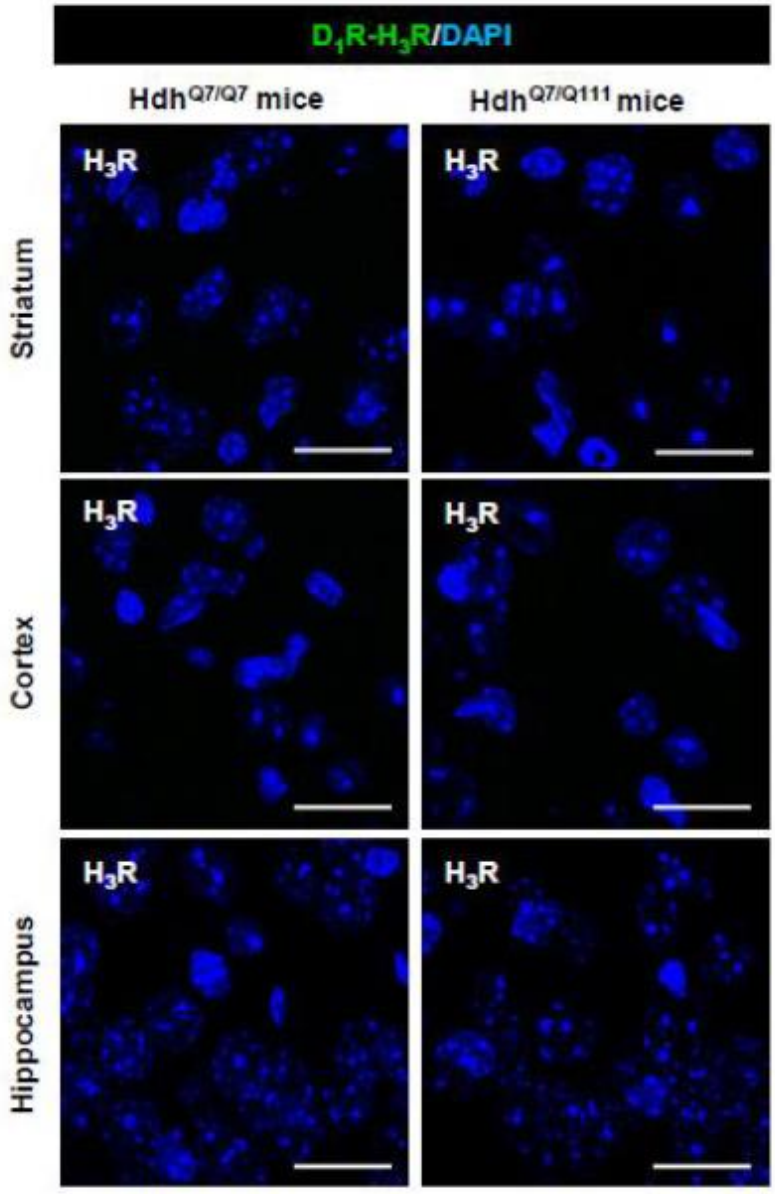


Figure S7. Negative controls for Proximity Ligation Assays (PLA) in mouse brain slices. Proximity Ligation Assays (PLA) were performed in the absence of the primary antibody against D1R, using striatal, cortical or hippocampal slices from 4-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. In all slices, a lack of green spots around blue colored DAPI stained nucleus was observed. Scale bar: 20 μm.

Supplementary Figure 8

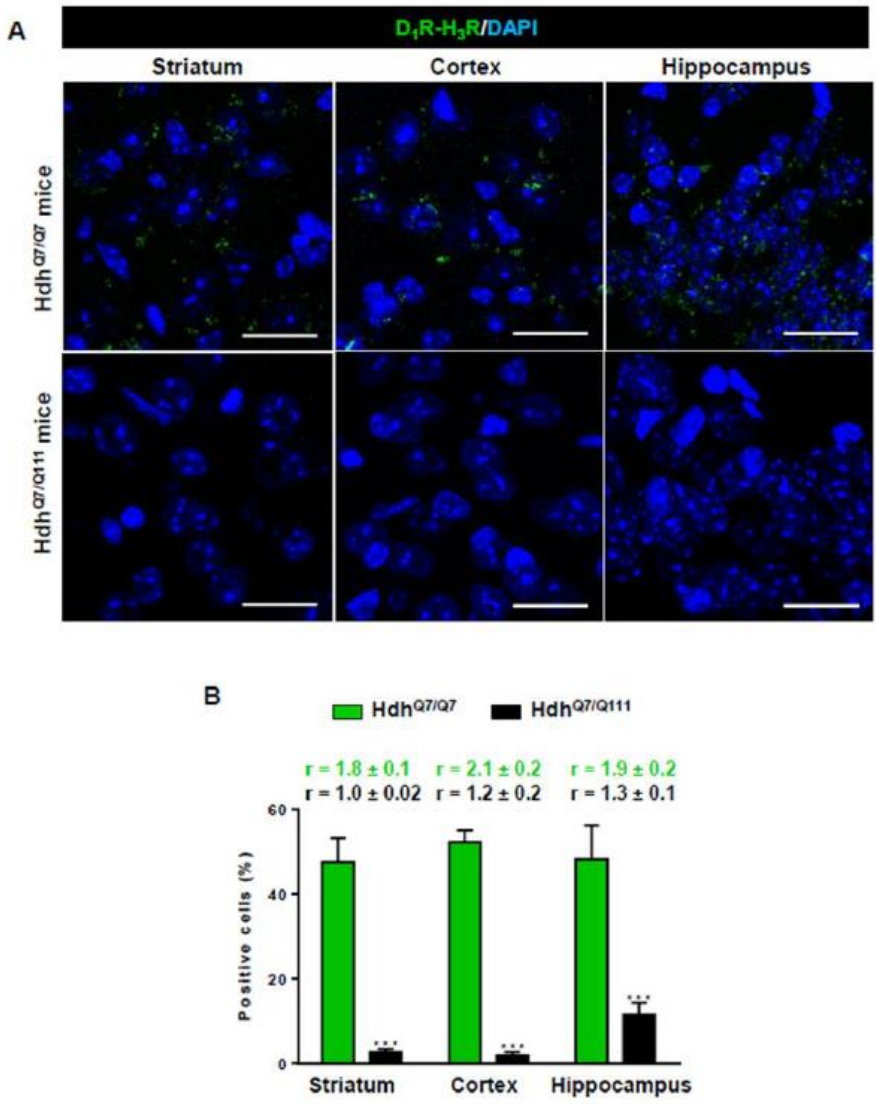


Figure S8. Expression of D1R-H3R heteromers in 6-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice chronically treated with saline. In (**A**), Proximity Ligation Assays (PLA) were performed in striatal, cortical and hippocampal slices from 6-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice treated with saline. D1R-H3R heteromers were visualized as green spots around blue colored DAPI stained nucleus in HdhQ7/Q7 mice but not in HdhQ7/Q111 mice chronically treated with saline. Scale bar: 20 μm. In (**B**), the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 4-8 different fields from 3 different animals. Student's *t* test showed significant differences in D1R-H3R heteromer expression (***p<0.001) compared to the respective HdhQ7/Q7 mice.

Supplementary Figure 9

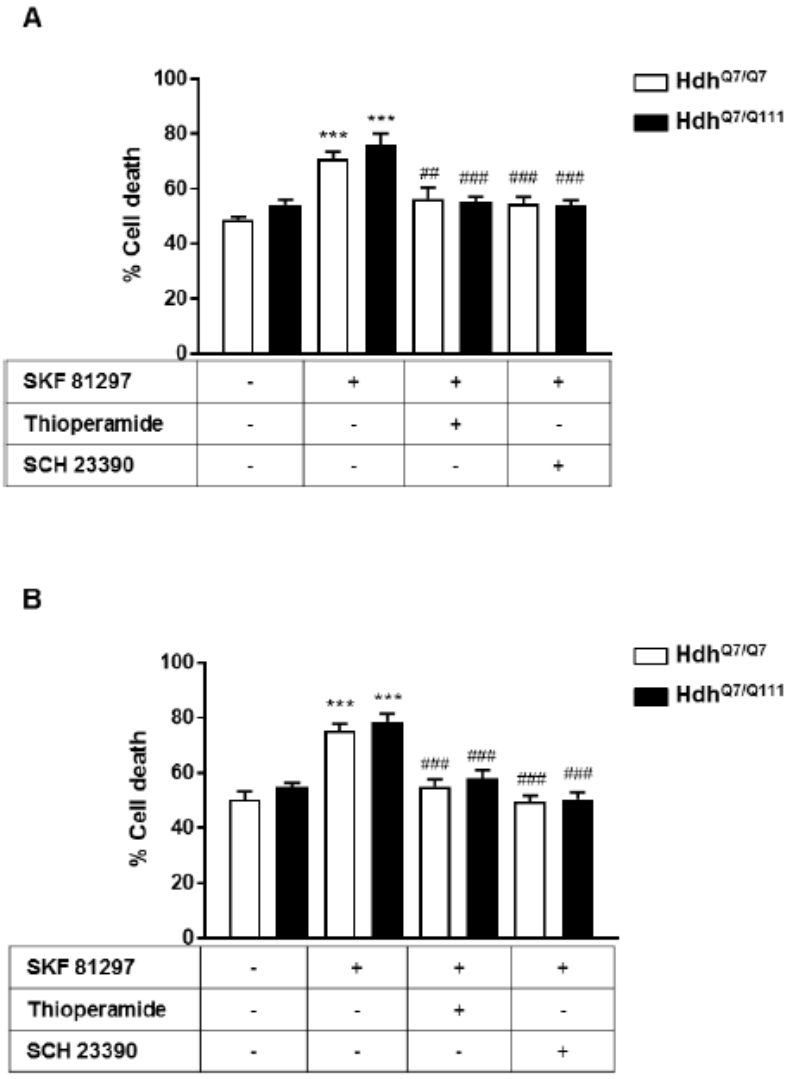


Figure S9. Functional D1R-H3R heteromers are expressed in 5-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. Striatal (A) and cortical (B) organotypic slice cultures from 5-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice were pre-treated for 60 min with vehicle, H3R antagonist thioperamide (10 μM) or D1R antagonist SCH 23390 (10 μM) before the addition of SKF 81297 (50 μM) and after 48h cell death was determined. Values represent mean ± SEM (n = 5 to 8) of percentage of cell death. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests showed a significant effect over vehicle treatment (***$p < 0.001$) or over SKF 81297 treated slices (###$p < 0.001$).

Supplementary Figure 10

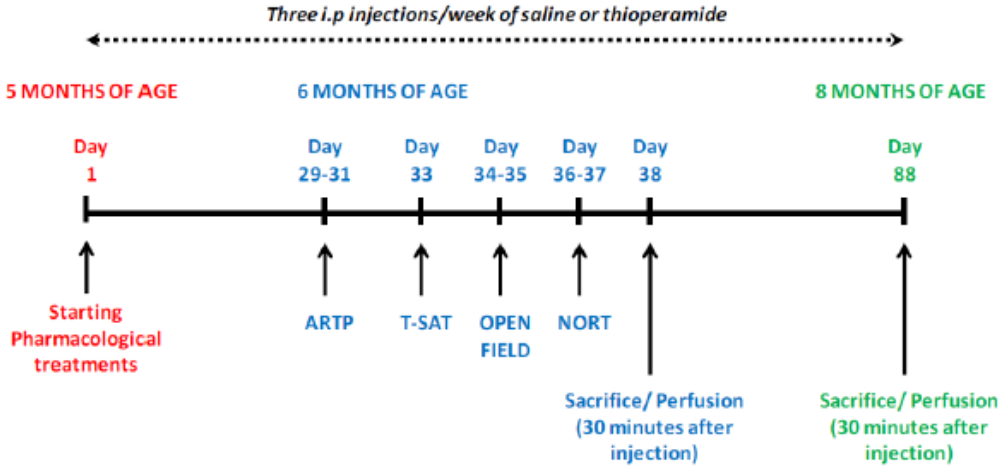


Figure S10. Schematic representation of pharmacological treatments and behavioral analysis performed after chronic treatment with saline or thioperamide. Three intraperitoneal injections per week of saline (NaCl 0.9% saline) or thioperamide (10 mg/Kg) were performed from 5-month-old to 8-month-old mice when the animals were sacrificed and perfused. Behavioral assessment started at 6 months of age with the evaluation of the ARTP, T-SAT, Open field and NORT. One cohort of animals was sacrificed and perfused 30 min after the last injection to evaluate PLA at 6 months of age. A second cohort of animals was sacrifice and perfused 30 minutes after the last injection to evaluate PLA at 8 months of age.

Supplementary Figure 11

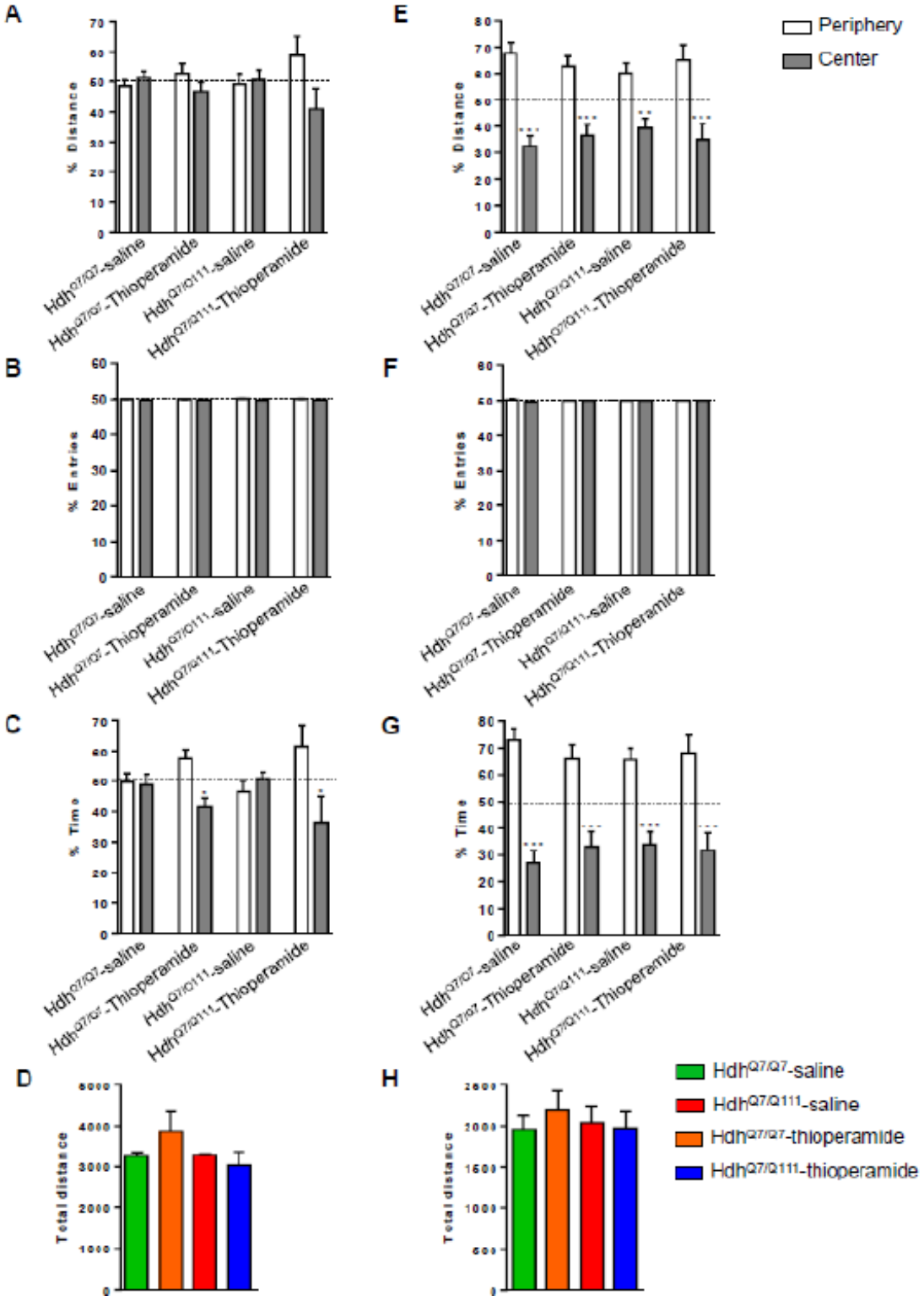


Figure S11. No significant differences in the open field habituation were found between treatments and genotypes. Motivation and anxiety differences between genotypes and treatments were analyzed by measuring the percentage of distance (**A** and **E**), the percentage of entries (**B** and **F**) and the percentage of time (**C** and **G**) between the periphery and the center in the open field arena at the first (**A**, **B** and **C**) or second (**E**, **F** and **G**) day of habituation in the open field arena. The spontaneous locomotor activity differences between genotypes and treatments were analyzed by measuring the total distance rove for each animal at first (**D**) or second (**H**) day of habituation in the open field arena. After two days of habituation in the open field arena, all mice behave equal. Data represents mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* comparisons; *p<0.05, ***p<0.001 compared to the periphery.

Supplementary Figure 12

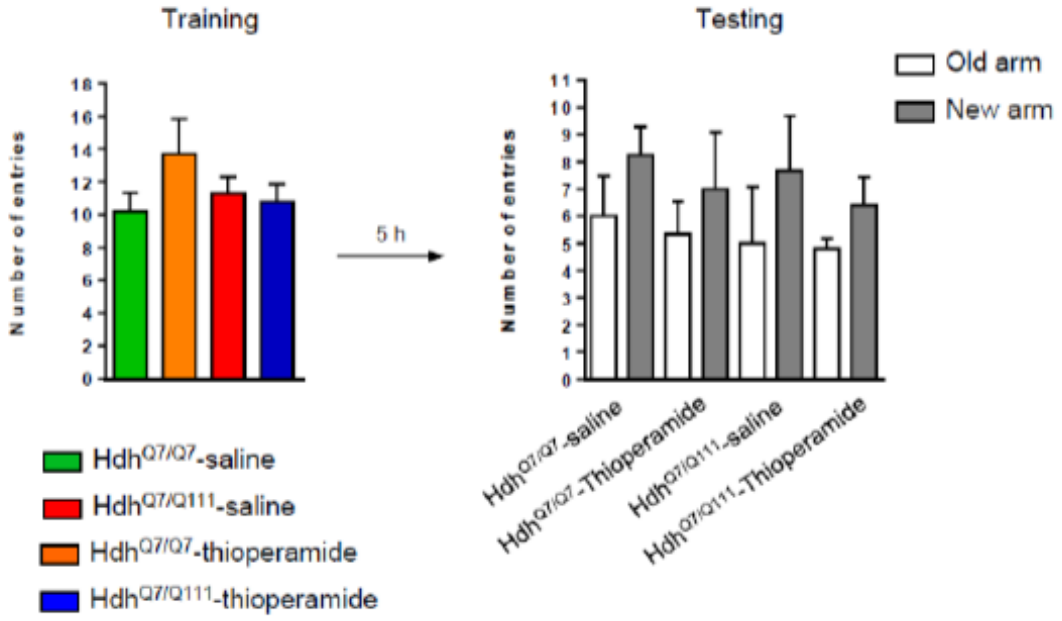


Figure S12. Training session in the T-SAT showed similar number of arm entries in all genotypes and treatments. 6-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice following the injection protocol in S8 showed no differences in spontaneous locomotor activity or anxiogenic components in training sessions of the T-maze. 11 saline-treated HdhQ7/Q7 mice, 10 thioperamide-treated HdhQ7/Q7 mice, 7 saline-treated HdhQ7/Q111 mice and 9 thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice were evaluated. Data represents mean ± SEM.

Supplementary Figure 13

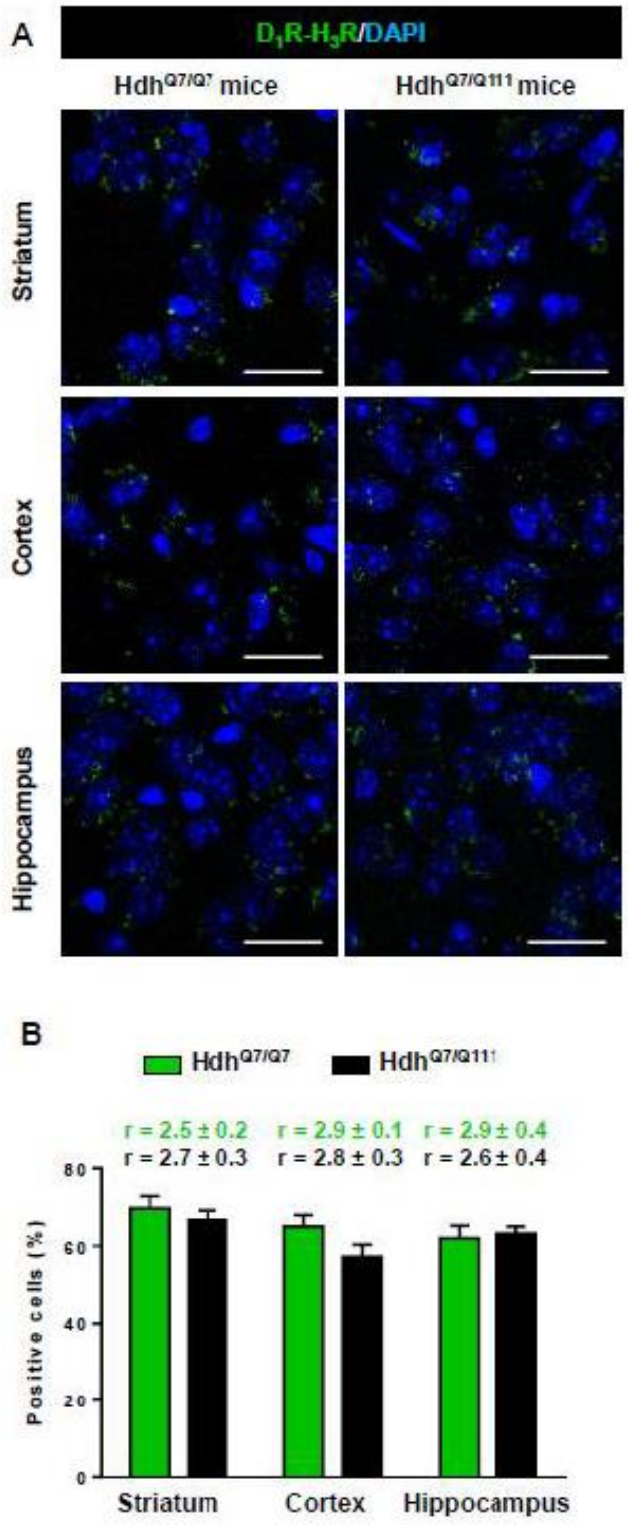


Figure S13. Expression of D1R-H3R heteromers in 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice chronically treated with thioperamide. In (**A**), Proximity Ligation Assays (PLA), were performed in striatal, cortical and hippocampal slices. D1R-H3R heteromers were visualized as green spots around blue colored DAPI stained nucleus in 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice chronically treated with thioperamide. Scale bar: 20 μm. In (**B**), the number of cells containing one or more green spots is expressed as the percentage of the total number of cells (blue nucleus). *r values* (number of green spots/cell containing spots) are shown above each bar. Data (% of positive cells or r) are the mean ± SEM of counts in 600-800 cells from 4-8 different fields from 3 different animals. Student's *t* test showed no significant differences in D1R-H3R heteromer expression in thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice compared to the respective HdhQ7/Q7 mice.

Supplementary Figure 14

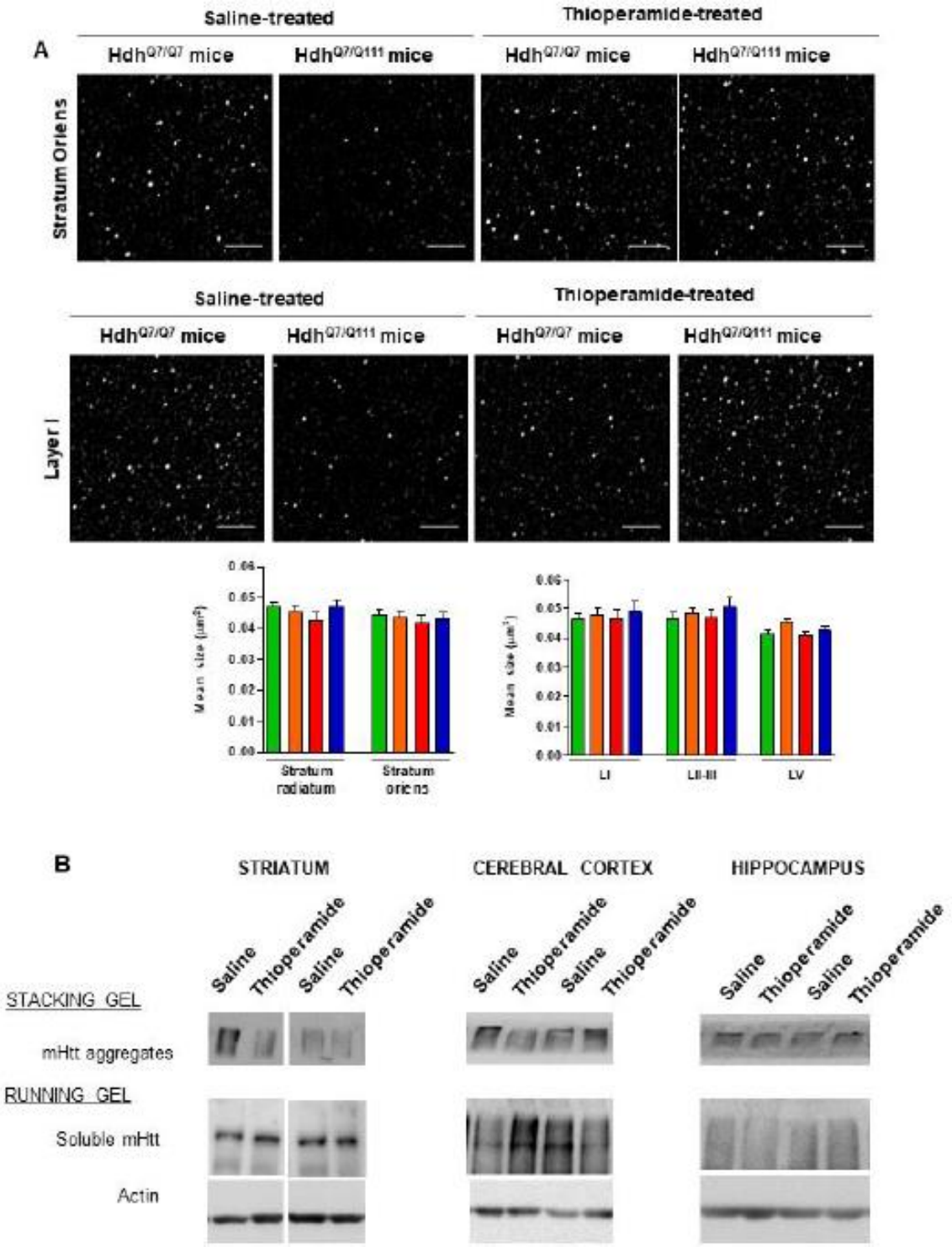


Figure S14. Biochemical and Pathological Effects of Thioperamide treatment. In (**A**), representative images showing spinophilin-immunoreactive puncta in the *stratum oriens* of CA1 hippocampus and in layer I of motor cortex area 1 (M1) of saline and thioperamide-treated WT HdhQ7/Q7 and knock-in HdhQ7/Q111 mice at 6 months of age. Quantitative analysis of the mean size of spinophilin-immunoreactive puncta in the *stratum radiatum* and *stratum oriens* of CA1 hippocampus and in layers I, II-III and V of motor cortex area 1 (M1) are shown as mean ± SEM (n= 9 images from three animals/group). Statistical analysis was performed using Student's two-tailed t test. No significant differences were found. Scale bar: 5 µm. In (**B**), Representative Western blots of total striatal, hippocampal and cortical extracts from 6-month-old saline and thioperamide-treated knock-in HdhQ7/Q111 mice. The blots were probed with 1C2 antibody for mutant huntingtin (mHtt). In samples from both saline and thioperamide-treated HdhQ7/Q111 mice insoluble oligomeric forms of mHtt were detected in the stacking gel and soluble forms were detected in the running gel.

Supplementary Figure 15

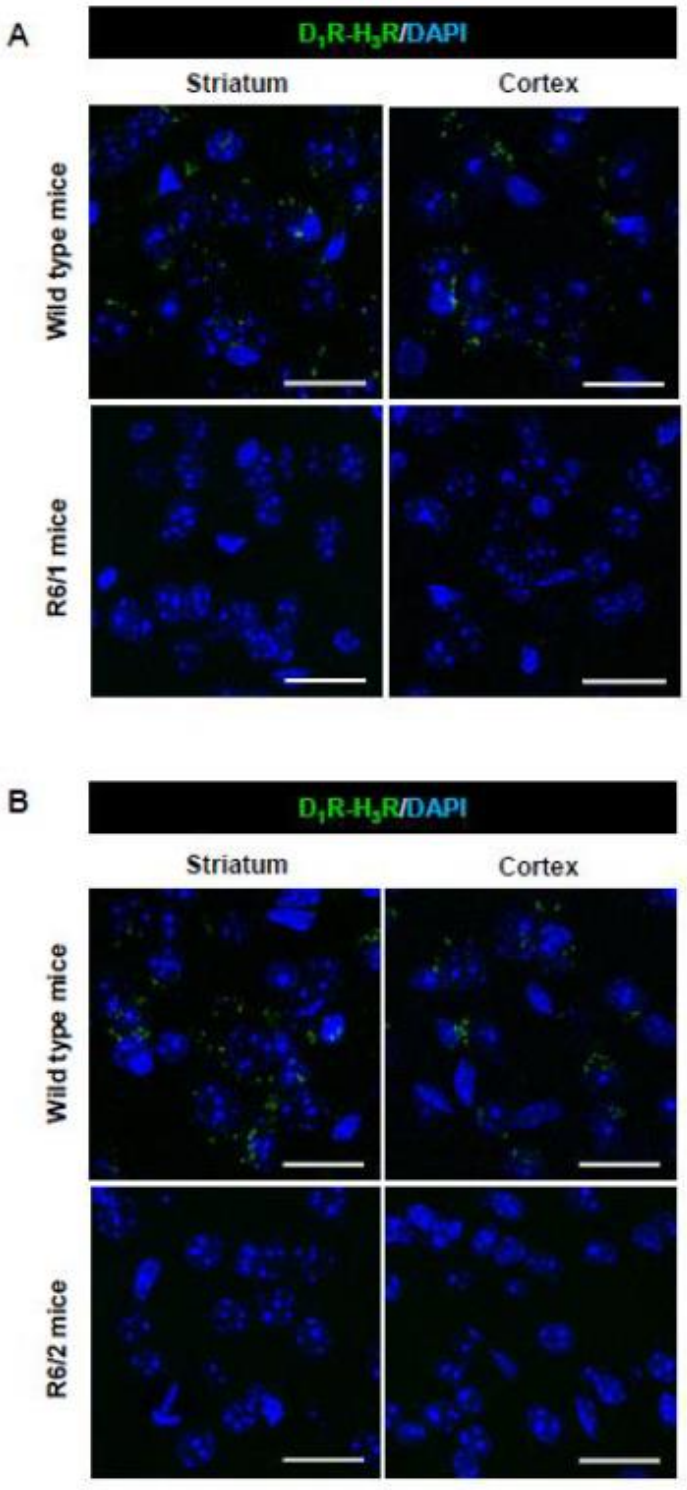


Figure S15. D1R-H3R heteromer are not expressed in HD R6/1 and R6/2 mouse models. Proximity Ligation Assays (PLA) were performed using striatal or cortical slices from age matched wild type littermates (WT) and 4-month-old R6/1 (**A**) or 8-week-old R6/2 mice (**B**). D1R-H3R heteromers were visualized only in wild-type mouse slices as green spots around blue colored DAPI stained nucleus. Scale bar: 20 μm.

Supplementary Table 1

Receptor	CELLS	STHdH^{Q7} B_{max} (fmol/mg protein)	STHdH^{Q7} K_D (nM)	STHdH^{Q111} B_{max} (fmol/mg protein)	STHdH^{Q111} K_D (nM)
H_3R	Striatal cells	160 ± 2	1.92 ± 0.07	160 ± 34	0.71 ± 0.25
D_1R	Striatal cells	200 ± 20	0.3 ± 0.1	220 ± 40	0.16 ± 0.08

Table S1. H3R and D1R binding parameters in STHdHQ7, STHdHQ111 cells. Striatal cells were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer and ligand binding was performed with membrane suspension (see materials and methods). Binding parameters from saturation and competition curves were obtained using Grafit software by fitting the binding data to the equation previously deduced (equation (3) in (*85*). Data are mean ± SEM of experiments performed per triplicate.

Supplementary Table 2

Receptor	BRAIN REGION	$Hdh^{Q7/Q7}$ B_{max} (fmol/mg protein)	$Hdh^{Q7/Q7}$ K_D (nM)	$Hdh^{Q7/Q111}$ B_{max} (fmol/mg protein)	$Hdh^{Q7/Q111}$ K_D (nM)
H_3R	Striatum	193 ± 6	0.27 ± 0.03	155 ± 6	0.26 ± 0.03
	Cortex	146 ± 4	0.22 ± 0.02	152 ± 8	0.24 ± 0.04
	Hippocampus	92 ± 1	0.20 ± 0.01	88 ± 3	0.37 ± 0.1
D_1R	Striatum	1088 ± 50	0.17 ± 0.02	529 ± 32	0.11 ± 0.01
	Cortex	99 ± 5	0.05 ± 0.01	73 ± 4	0. 01 ± 0.01
	Hippocampus	257 ± 10	0.03 ± 0.02	187 ± 19	0.09 ± 0.07

Table S2. H3R and D1R binding parameters in different brain regions from 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. Mouse striatal, cortical or hippocampal tissue were homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer and ligand binding was performed with membrane suspension (see online methods). Binding parameters from saturation and competition curves were obtained using Grafit software by fitting the binding data to the equation previously deduced (equation (3) in (*107*). Data are mean ± SEM of experiments performed per triplicate (n=6 HdhQ7/Q7 and n=5 HdhQ7/Q111).

Supplementary Table 3

Receptor	BRAIN REGION	Age	$Hdh^{Q7/Q7}$ mRNA fold increase	$Hdh^{Q7/Q111}$ mRNA fold increase
H_3R	Striatum	4 months	1.01 ± 0.12	0.73 ± 0.15
		8 months	0.74 ± 0.18	0.87 ± 0.16
D_1R	Striatum	4 months	1.04 ± 0.17	0.83 ± 0.08
		8 months	0.82 ± 0.06	0.76 ± 0.07

Table S3. H3R and D1R mRNA expression levels the striatum of 4- and 8-month-old HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 mice. RT-PCR was performed in striatal extracts from HdhQ7/Q7 and HdhQ7/Q111 at 4 and 8 months of age as described in materials and methods. Results were normalized to actin gene expression. Data represent mean ± SEM (n=3-4) of experiments performed in duplicate and are expressed as fold change of wild-type animals. Student's two-tailed *t* test was performed.

3.3 Complejos de heterorreceptores formados por receptores D_1 de dopamina, H_3 de histamina y N-metil-D-aspartato de glutamato como dianas para prevenir la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer

Mar Rodríguez-Ruiz*, Estefanía Moreno*, David Moreno-Delgado*, Gemma Navarro, Josefa Mallol, Antonio Cortés, Carme Lluís, Enric I. Canela, Vicent Casadó*, Peter J. McCormick*, Rafael Franco*

*Contribuyeron igualmente

Artículo publicado en *Molecular Neurobiology, 2017 Aug;54(6):4537-4550. doi: 10.1007/s12035-016-9995-y*

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un desorden neurodegenerativo causante de pérdida de memoria progresiva y disfunción cognitiva. Las estrategias anti-AD tienen como diana a receptores celulares a los que consideran como unidades aisladas. Sin embargo, muchos receptores de la superficie celular cooperan y contactan entre sí físicamente formando complejos con distintas propiedades bioquímicas que los receptores individuales. Aquí se ha descubierto la existencia de heterómeros formados por receptores D_1 de dopamina, H_3 de histamina y N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato en sistemas de expresión heteróloga y en corteza cerebral murina. Los heterómeros se detectaron mediante co-inmunoprecipitación y ensayos de ligación por proximidad en corteza cerebral de rata, donde agonistas del receptor H_3, por un fenómeno de comunicación cruzada negativa, y antagonistas de H_3, por un fenómeno de antagonismo cruzado, disminuyeron la señalización inducida por agonistas del receptor D_1 determinada por fosforilación de ERK 1/2 o Akt, y contrarrestaron la muerte celular excitotóxica mediada por el receptor D_1. Antagonistas de los receptores D_1 y del H_3 también contrarrestaron la toxicidad inducida por NMDA, sugiriendo una interacción compleja entre el receptor NMDA y la función del heterómero de receptores D_1-H_3. Debido probablemente a la heteromerización, los receptores H_3 actúan como reguladores alostéricos de los receptores D_1 y NMDA. Mediante transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), demostramos que tanto receptores D_1 como H_3 pueden formar heterómeros con las subunidades NR1A/NR2B del receptor NMDA. Se detectaron complejos de receptores D_1-H_3-NMDA mediante BRET por complementación fluorescente. La expresión endógena de estos complejos en corteza de ratón se determinó mediante ensayos de PLA y se observó una expresión similar en ratones control y ratones APP/PS1. De acuerdo con la existencia de interacciones alostéricas receptor-receptor en el complejo, antagonistas del receptor H_3 redujeron la muerte celular excitotóxica mediada tanto por el receptor NMDA como por el D_1, en cultivos organotípicos corticales. Además, los antagonistas de H_3 revirtieron la toxicidad inducida por péptido amiloide $\beta_{1\text{-}42}$. Por consiguiente, los receptores H_3 en los complejos de heteroreceptores D_1-H_3-NMDA se presentan como dianas prometedoras para prevenir la neurodegeneración.

Mol Neurobiol
DOI 10.1007/s12035-016-9995-y

Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D_1, Histamine H_3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease

Mar Rodríguez-Ruiz[1,2] · Estefanía Moreno[1,2] · David Moreno-Delgado[1,2] · Gemma Navarro[1,2] · Josefa Mallol[1,2] · Antonio Cortés[1,2] · Carme Lluís[1,2] · Enric I. Canela[1,2] · Vicent Casadó[1,2] · Peter J. McCormick[1,2,3] · Rafael Franco[1,2,4]

Received: 17 March 2016 / Accepted: 14 June 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder causing progressive memory loss and cognitive dysfunction. Anti-AD strategies targeting cell receptors consider them as isolated units. However, many cell surface receptors cooperate and physically contact each other forming complexes having different biochemical properties than individual receptors. We here report the discovery of dopamine D_1, histamine H_3, and N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor heteromers in heterologous systems and in rodent brain cortex. Heteromers were detected by co-immunoprecipitation and in situ proximity ligation assays (PLA) in the rat cortex where H_3 receptor agonists, via negative cross-talk, and H_3 receptor antagonists, via cross-antagonism, decreased D_1 receptor agonist signaling determined by ERK1/2 or Akt phosphorylation, and counteracted D_1 receptor-mediated excitotoxic cell death. Both D_1 and H_3 receptor antagonists also counteracted NMDA toxicity suggesting a complex interaction between NMDA receptors and D_1-H_3 receptor heteromer function. Likely due to heteromerization, H_3 receptors act as allosteric regulator for D_1 and NMDA receptors. By bioluminescence resonance energy transfer (BRET), we demonstrated that D_1 or H_3 receptors form heteromers with NR1A/NR2B NMDA receptor subunits. D_1-H_3-NMDA receptor complexes were confirmed by BRET combined with fluorescence complementation. The endogenous expression of complexes in mouse cortex was determined by PLA and similar expression was observed in wild-type and APP/PS1 mice. Consistent with allosteric receptor-receptor interactions within the complex, H_3 receptor antagonists reduced NMDA or D_1 receptor-mediated excitotoxic cell death in cortical organotypic cultures. Moreover, H_3 receptor antagonists reverted the toxicity induced by $ß_{1–42}$-amyloid peptide. Thus, histamine H_3 receptors in D_1-H_3-NMDA heteroreceptor complexes arise as promising targets to prevent neurodegeneration.

Keywords Alzheimers disease · Dementia · G-protein-coupled receptors · Heteroreceptor complexes · Ionotropic receptor · Neuroprotection · Receptor heteromers · Parkinson's disease · Neurodegeneration · Transgenic animals

Mar Rodríguez-Ruiz, Estefanía Moreno, David Moreno-Delgado, Vicent Casadó, Peter J. McCormick and Rafael Franco contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12035-016-9995-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rafael Franco
rfranco@ub.edu; rfranco123@gmail.com

[1] Molecular Neurobiology laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

[2] Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

[3] Present address: School of Pharmacy, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich NR4 7TJ, UK

[4] Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, Prevosti Building, 08028 Barcelona, Spain

Introduction

Current Alzheimer's disease (AD) therapies mainly target acetyl cholinesterase to enhance cholinergic neurotransmission. However, neurodegeneration is not limited to a specific neurotransmitter system. Glutamatergic, serotonergic, adrenergic, dopaminergic, and peptidergic neurotransmitter systems are also deregulated in AD [1]. Impaired neuronal signaling may affect amyloid precursor protein (APP) proteolysis and

Published online: 01 July 2016

promote amyloid formation in the AD brain. In addition, amyloid toxicity and neurodegeneration may affect neurotransmission, suggesting the involvement of complex positive-feedback loops in the pathogenesis of the disease. Consequently, a complementary approach that includes modulation of neurotransmission in addition to lowering the amyloid burden is an attractive therapeutic strategy for the treatment of AD [1–3]. Indeed, activation of dopamine D_1-like receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid oligomers [4] and we and others have shown that dopamine facilitates hippocampal acetyl-choline release by acting on D_1-like receptors that are G protein-coupled receptors (GPCR) located in hippocampal cholinergic terminals [5–8]. Moreover, activation of dopamine D_1 receptors (D_1R) enables working memory by enhancing the firing of pyramidal neurons [9, 10]. Thus, the dopaminergic system is a key neurotransmitter system involved in AD. Another key neurotransmitter system implicated in AD is the histaminergic system [11–15] and GPCR histamine H3 receptors (H_3R) are widely expressed in the CNS, particularly in the frontal cortex and hippocampus [16]. H_3R antagonists are promising drugs for AD [17–19] but the exact mode of action is more complex than suspected. One potential mechanism may be the blockade of histamine receptors in a specific CNS hetero-oligomeric context. Indeed, hetero-oligomerization of proteins is a recurrent phenomenon in biology [20, 21]. Dopamine D_1 GPCRs interact in striatum with inter alia the histamine H_3 receptor. Whereas D_1 receptors are coupled to heterotrimeric G_s proteins and histamine H_3 receptors couple to G_i/G_o, D_1/H_3 receptor heteromers (D_1/H_3RHets) allow histamine H_3 receptor agonists to activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. The link between histamine receptors and MAPK depends on heteromer formation as it does not happen in D_1 receptor-deficient mice [6, 22].

In the case of ionotropic glutamate receptors, formation of hetero-oligomers is needed for proper function. In transfected cells, N-methyl-D-aspartate (NMDA) regulates dopamine D_1 receptor trafficking and desensitization by a direct interaction between the ionotropic glutamate (NMDA) and the metabotropic dopamine (D_1) receptors [23]. Lee et al. (2002) showed, also in an heterologous system, that the cytoplasmic tail of the D_1 receptor has two epitopes to interact with NR1-1a and NR2A subunits of the NMDA receptor [24, 25]. The interaction with NR1-1a affects NMDA receptor-mediated excitotoxicity while the interaction with NR2A affects ligand-gated currents. Besides inhibitors of acetyl cholinesterase, the only drug approved for Alzheimer's disease is Namendal^R whose active component, memantine, is an allosteric modulator of NMDA receptors [26], which remain one of the main therapeutic targets in this neurodegenerative disease [27]. As heteroreceptor complexes formed by different GPCRs [28] or by combination of GPCR and ionotropic receptors [29] have specific physiological functions and emerge as novel therapeutic targets, the aim of the present paper was to look for heteromers formed by dopamine D_1, histamine H_3, and NMDA receptors and to assess their potential as targets in Alzheimer's disease.

Materials and Methods

Animals

Two-month-old male Sprague Dawley rats (animal facility of the Faculty of Biology, University of Barcelona) were housed two per cage and kept on a 12/12-h dark/light cycle with food and water available ad libitum and experiments were performed during the light cycle. Animals were anesthetized with 4 % isoflurane and euthanized by decapitation. APP/PS1 mice and wild-type (WT) littermates were used. The generation of mice expressing the human mutated forms of the amyloid precursor protein (APPswe) and presenilin-1 (PS1dE9) is described elsewhere [3]. In the present study, identification of transgenic mice was carried out as follows: genomic DNA was isolated from 1-cm tail clips and genotyped by polymerase chain reaction (PCR) technique using the PCR conditions proposed by the Jackson Laboratory (www.jax.org). Animals were maintained under standard animal housing conditions in a 12-h dark–light cycle with free access to food and water. Animal procedures were conducted according to ethical guidelines (European Communities Council Directive 2010/63/EU) and approved by the animal experimentation ethics committee of the Catalan Government (CEEA-DAAM 6419 and CEEA/DMAH 4049 and 5664).

Co-Immunoprecipitation Experiments

Rat cortical tissue was homogenized at 4 °C in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, containing a protease inhibitor mixture (1/1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using a Polytron homogenizer, and membranes were obtained by centrifugation at 105,000*g* for 1 h at 4 °C. Membranes were washed three more times at the same conditions and were solubilized by homogenization in ice-cold immunoprecipitation buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.4, containing 1 % (*v*/*v*) Nonidet P-40) and incubated for 30 min on ice before centrifugation at 105,000*g* for 1 h at 4 °C. Using a Dynabeads® Protein G kit (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK), the supernatant (1 mg/ml of protein) was processed as described in the immunoprecipitation protocol. Protein content was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce) using bovine serum albumin dilutions as standard. Immunoprecipitation was carried out with a rat anti-D_1 receptor antibody (1:1000, Sigma-Aldrich). As negative control, anti-calnexin antibody was used (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Immunoprecipitates were separated on a denaturing

10 % SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes to perform western blot assays. Membranes were probed with guinea pig anti-D_1 receptor (1:1000, Frontier Institute, Ishikari, Hokkaido, Japan) and rabbit anti-H_3 receptor (1:1000, Alpha diagnostic, San Antonio, Texas, USA) antibodies and the appropriate secondary antibodies: goat anti-guinea pig-peroxidase (1:20,000, Sigma-Aldrich) and goat anti-rabbit-peroxidase (1:20,000, Thermo Scientific, Fremont, CA). Bands were visualized with a LAS-3000 equipment (Fujifilm). Data analysis was performed by Image Gauge software (version 4.0) and Multi Gauge software (version 3.0).

Preparation of Rat and Mouse Brain Sections and Slices

For PLA experiments, rat and mouse brains were rapidly removed and fixed with 4 % paraformaldehyde solution for 24 h at 4 °C. Brains were then washed in PBS, cryo-preserved in a 30 % sucrose solution for 48 h at 4 °C, and stored at −20 °C until sectioning. Cortical 15-μm thick sections were cut on a freezing cryostat (Leica Jung CM-3000, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) and mounted on glass slides. For cell death determination and signaling experiments, the brains were rapidly removed and placed in ice-cold oxygenated (O_2/CO_2: 95/5 %) Krebs-bicarbonate buffer (in millimolars: 124 NaCl, 4 KCl, 1.25 KH_2PO_4, 1.5 $MgCl_2$, 1.5 $CaCl_2$, 10 glucose, and 26 $NaHCO_3$) pH 7.4. The brains were sliced along the coronal plane at 4 °C using a brain matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, USA). Cortical slices (500 μm thick) were kept at 4 °C in Krebs-bicarbonate buffer during the dissection.

Cell Culture, Expression Vectors and Transient Transfection

Human embryonic kidney (HEK-293 T) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 units/milliliter penicillin/streptomycin, MEM non-essential amino acid solution (1/100), and 5 % (*v*/*v*) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen). For transfection, sequences encoding receptors or fusion proteins consisting of the human receptors fused to *Renilla luciferase* (Rluc) or to yellow fluorescent protein (YFP) on the C-terminal end of the receptor (D_1R-YFP, H_3R-YFP, CB_1R-Rluc), of human (H_3, D_1, and CB_1) receptors fused to the YFP Venus N-terminal fragment (n-YFP), or of human (serotonin 5-HT_{2B}, H_3, and D_1) fused to the YFP Venus C-terminal fragment (c-YFP) were obtained and characterized as previously described (Navarro et al. 2008; [6, 7, 31, 32].

Plasmids encoding human NR1A-Rluc and NR2B were generously provided by Dr. Julie Perroy from the University of Montpellier (France). HEK-293 T cells growing in 35-mm diameter six-well plates were transiently transfected with cDNAs by the ramified polyethylenimine (PEI; Sigma-Aldrich) method. Cells were incubated (4 h) with cDNAs, ramified PEI (5 ml/mg cDNA of 10 mM PEI) and 150 mM NaCl in a serum-free medium. After 4 h, the medium was changed to a fresh complete culture medium. Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice in quick succession in HBSS containing the following (in millimolars): 137 NaCl, 5 KCl, 0.34 $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$, 0.44 KH_2PO_4, 1.26 $CaCl_2 \times 2\ H_2O$, 0.4 $MgSO_4$ heptahydrate, 0.5 $MgCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4, supplemented with 0.1 % glucose (*w*/*v*), detached by gently pipetting, and resuspended in the same buffer. To control the cell number, sample protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad) using bovine serum albumin (BSA) dilutions as standards. HEK-293 T cell suspension (20 μg of protein) was distributed into 96-well microplates; black plates with a transparent bottom (Porvair, King's Lynn, UK) were used for fluorescence determinations, whereas white opaque plates (Sigma-Aldrich) were used for bioluminescence resonance energy transfer (BRET) experiments.

Fluorescence Complementation Assays

HEK-293 T cells were transiently co-transfected with the cDNA encoding for H_3, D_1, or CB_1 receptors fused to the YFP Venus N-terminal fragment (n-YFP) and 5-HT_{2B}, H_3, or D_1 receptors fused to the YFP Venus C-terminal fragment (c-YFP). To quantify the amount of reconstituted YFP Venus, cells (20 μg protein) were distributed in 96-well plates (black plates with a transparent bottom, Porvair), and emission fluorescence at 530 nm was read in a FluoStar Optima plate fluorometer (BMG Labtechnologies, Ortenberg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10-nm bandwidth excitation filter at a 400-nm reading. Protein fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells not expressing the fusion proteins (basal). Cells expressing two receptor-cYFP or two receptor-nYFP fusion proteins showed similar fluorescence levels to non-transfected cells.

BRET and BRET with Bimolecular Fluorescence Complementation

HEK293 T cells were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for the receptor fused to Rluc and with increasing amounts of cDNA for the receptor fused to YFP (see figure legends). To quantify receptor-YFP expression, fluorescence of cells (20 μg protein) was read in a FluoStar Optima Microplate Fluorometer (BMG Labtechnologies) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10-nm bandwidth excitation filter at 400 nm

reading. For bioluminescent resonance energy transfer (BRET) or BRET with bimolecular fluorescence complementation (BiFC) measurements, 5 μM coelenterazine H (Invitrogen) was added to the equivalent of 20 μg of cell suspension. After adding coelenterazine H (1 min for BRET or 5 min for BRET with BiFC), readings were collected using a Mithras LB 940 that allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm (440–500 nm) and the long-wavelength filter at 530 nm (510–590 nm). To quantify receptor-Rluc expression, luminescence readings were also performed after 10 min of adding 5 μM coelenterazine H. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]−cf., where cf. corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the donor construct expressed alone in the same experiment. Data were fitted to a nonlinear regression equation, assuming a single-phase saturation curve with GraphPad Prism software. BRET is expressed as milliBRET units (mBU).

Determination of Phospho-Extracellular-Signal Regulated Kinase (ERK1/2) and Phospho-Akt/Protein Kinase B (PKB)

After dissection, fresh cortical slices were transferred into 1 ml of ice-cold Krebs-bicarbonate buffer. The temperature was raised to 23 °C and after 30 min, the culture medium was replaced by 2 ml of fresh Krebs-bicarbonate buffer (23 °C). Slices were incubated under constant oxygenation (O_2/CO_2: 95 %/5 %) at 30 °C for 4–5 h in an Eppendorf thermomixer (5 Prime, Inc., Boulder, CO, USA). The medium was replaced by 200 μl of fresh Krebs-bicarbonate buffer and incubated for 30 min before the addition of any agent. Slices were treated with the indicated ligand concentration for the indicated time and lysed with (in millimolars) 50 Tris–HCl pH 7.4, 50 NaF, 150 NaCl, 45 mM glycerol-3-phosphate, 0.02 phenyl-arsine oxide, 0.4 $NaVO_4$, and 1 % Triton X-100 and protease inhibitor cocktail. Cellular debris was removed by centrifugation at 13,000*g* for 10 min at 4 °C and total protein was quantified by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin dilutions as standard. To determine the degree of protein phosphorylation, equivalent amounts of protein were separated by electrophoresis on a denaturing 10 % SDS-polyacrylamide gel and transferred onto PVDF-FL membranes. Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) was then added, and the membrane was rocked for 90 min. The membranes were then probed overnight with a mixture of a mouse anti-phospho-ERK1/2 antibody (1:2500; Sigma-Aldrich), a rabbit anti-phospho-Ser473-Akt antibody (1/2500, SAB Signalway Antibody, Pearland, Texas, USA), and a rabbit anti-ERK1/2 antibody that recognizes both phosphorylated and unphosphorylated ERK1/2 (1:40,000; Sigma-Aldrich). The 42- and 44-kDa bands corresponding to ERK1 and ERK2 were visualized by the addition of a mixture of IRDye 800 (anti-mouse) antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich) and IRDye 680 (anti-rabbit) antibody (1:10,000; Sigma-Aldrich) for 2 h and scanned by the Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). Band densities were quantified using the scanner software and exported to Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA). The level of phosphorylated ERK1/2 isoforms or of pAkt/PKB was normalized for differences in loading using the total ERK1/2 protein band intensities.

Cell Death Determination in Rat and Mouse Organotypic Cultures

Immediately after dissection, brain slices (500 μm thickness, see above) were placed in six-well plates containing Millicell-CM organotypic tissue culture plate inserts (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and cultured at 37 °C with Neurobasal medium supplemented with 20 % horse serum, 0.5 % B27, 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, MEM non-essential amino acid solution (1/100), and 100 units/milliliter penicillin/streptomycin (all supplements were from Invitrogen). After 24 h, culture medium was replaced by fresh medium containing no ligands or the indicated concentrations of SKF-81297, SCH-23390, NMDA, MK-801, or thioperamide 1 h before the addition of the excitotoxic agents (D_1 or NMDA receptor agonists at 50 μM). Slices were maintained 48 h more in culture and, after a total 72 h of incubation, 10 μM propidium iodide (PI) was added to culture medium, which was maintained at 37 °C for 1 h. Slices were then removed from the incubator, washed twice in cold-PBS and fixed with 4 % paraformaldehyde for 1 h at 4 °C. Nuclei were stained with 1:1000 Hoechst for 1 h. Total (Hoechst-stained) and PI-positive nuclei were quantified to evaluate cell death using Leica SP2 confocal microscope (20×; UV, 561 lasers) and the quantification program Image-based Tool for Counting Nuclei for ImageJ.

In Situ Proximity Ligation Assays (PLA)

Rat or mouse cortical brain sections were mounted on glass slides, thawed at 4 °C, washed in 50 mM Tris–HCl, 0.9 % NaCl pH 7.8 buffer (TBS), permeabilized with TBS containing 0.01 % Triton X-100 for 10 min, and repeatedly washed with TBS. Heteromers were detected using the Duolink II in situ proximity ligation assays (PLA) detection Kit (Sigma-Aldrich) following the instructions of the supplier. To detect D_1-H_3, NMDA/NR1-D_1, or NMDA/NR1-H_3 heteroreceptor complexes, we used a mixture of equal amounts of the following pairs of primary antibodies: (i) guinea pig anti-D_1 receptor (Frontier Institute, Hokkaido, Japan) and rabbit anti-H_3 (Alpha diagnostic) receptors, (ii) guinea pig anti-D_1 and rabbit anti-NMDA/NR1 (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) antibodies, or (iii) rabbit anti-NMDA/NR1 antibody directly

coupled to a *minus* DNA chain and rabbit anti-H_3 receptor antibody directly coupled to a *plus* DNA chain (obtained following the instructions of the Sigma-Aldrich supplier). PLA probes detecting guinea pig or rabbit antibodies were used to detect D_1-H_3 and NMDA/NR1-D_1 receptor complexes. Then samples were processed for ligation and amplification and were mounted using a DAPI-containing mounting medium. Samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (N.A. 1.4), and a 405-nm and a 561-nm laser lines. For each field of view a stack of two channels (one per staining) and six to seven Z stacks with a step size of 1 μm were acquired. Quantification of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and, in cells containing spots, the ratio *r* (number of red spots/cell) were determined, using the Fiji package (http://pacific.mpi-cbg.de/), considering a total 1000–2000 cells from 7 to 16 different fields from three different animals. Nuclei and red spots were counted on the maximum projections of each image stack. After getting the projection each channel was processed individually. The nuclei were segmented by filtering with a median filter, subtracting the background, enhancing the contrast with the Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) plug-in, and finally applying a threshold to obtain the binary image and the regions of interest (ROI) around each nucleus. Red spot images were also filtered and thresholded to obtain the binary images. Red spots were counted in each of the ROIs obtained in the nuclei images. The number of red dots after PLA was negligible in the negative controls constituted by sections only incubated with one primary antibody (anti-D_1R in rat and mouse slices and anti-H_3R in mouse slices).

Statistical Analysis

The data in the graphs are presented as the mean ± SEM. Statistical analysis was performed with SPSS 18.0 software. The test of Kolmogorov–Smirnov with the correction of Lilliefors was used to evaluate the fit of the data to a normal distribution and the test of Levene to evaluate the homogeneity of variance. Significance was analyzed by two-way or one-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's test (see figure legends) for multiple comparisons. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Results

Identification of Heteromers in Brain Cortex

D_1/H_3 heteroreceptor complexes (D_1/H_3RHets) have been described in the striatum [22]. In an attempt to identify D_1/H_3RHets in the cerebral cortex, co-immunoprecipitation and in situ proximity ligation assays (PLA) were performed in rat samples. Detergent extracts from rat cortex were immunoprecipitated with antibodies against D_1 receptors and immunoblotted using either anti-D_1 or anti H_3-receptor antibodies. Results depicted in Fig. 1a–c indicate that immunoprecipitates contained both receptors. The in situ proximity ligation assay (PLA), which allows detection of proteins in close proximity, confirmed in cortical sections that D_1 and H_3 receptors form aggregates, detected as red dots in some of the neural cells (Fig. 1d). The number of red dots after PLA was negligible in the negative controls constituted by sections only incubated with one primary antibody (anti-D_1 receptor antibody; Fig. 1e).

As previously reported, D_1/H_3RHets may couple to the MAP kinase pathway [22]. Slices from rat cortex were incubated (8 min) with agonists, and ERK1/2 and Akt phosphorylation were assayed. Activation of D_1 or H_3 receptors using, respectively, 1 μM SKF-81297 or 1 μM imetit, led to significant ERK1/2 phosphorylation that was blocked by their respective selective antagonists (10 μM SCH-23390 or thioperamide). Interestingly, the antagonist of D_1 receptors blocked the effect of H_3 receptor agonists and the antagonist of H_3 receptors blocked the effect of D_1 receptor agonists (Fig. 2a). Fairly similar results were obtained on analyzing pAkt data (Fig. 2b). Such cross-antagonism is one common feature of receptor heteromers that may be considered as a D_1/H_3RHet print.

Since previous reports from different laboratories [23, 24] have described the in vitro interaction between the NR1A subunit of NMDA receptor and D_1 receptors, we investigated by PLA whether aggregates formed by NMDA and D_1 receptors or NMDA and H_3 receptors could be detected in sections from rat cortex. PLA experiments were performed in rat cortical sections using antibodies specific for the two GPCRs and for the NR1A subunit. PLA data indicated the existence of NR1A-D_1 or NR1A-H_3 receptors in close proximity (Fig. 3a, b). Very few red dots were found in negative controls performed with primary antibodies against D_1, Fig. 1e, or against H_3 receptors (not shown). Overall, these results indicate that the three proteins, D_1, H_3, and NMDA glutamate receptors, may be as close as to form heteromeric complexes in the brain cortex.

In Vitro Identification of Heteromers Formed by D_1, H_3, and NMDA Receptors

The next aim was to establish whether D_1, H_3, and NMDA receptors could form heteromeric complexes in heterologous cells expressing the three receptors. To attempt to identify the formation of direct interactions involving these receptors, a combination of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) was undertaken [30]. HEK-293 T cells were transfected with cDNAs encoding for fusion proteins formed

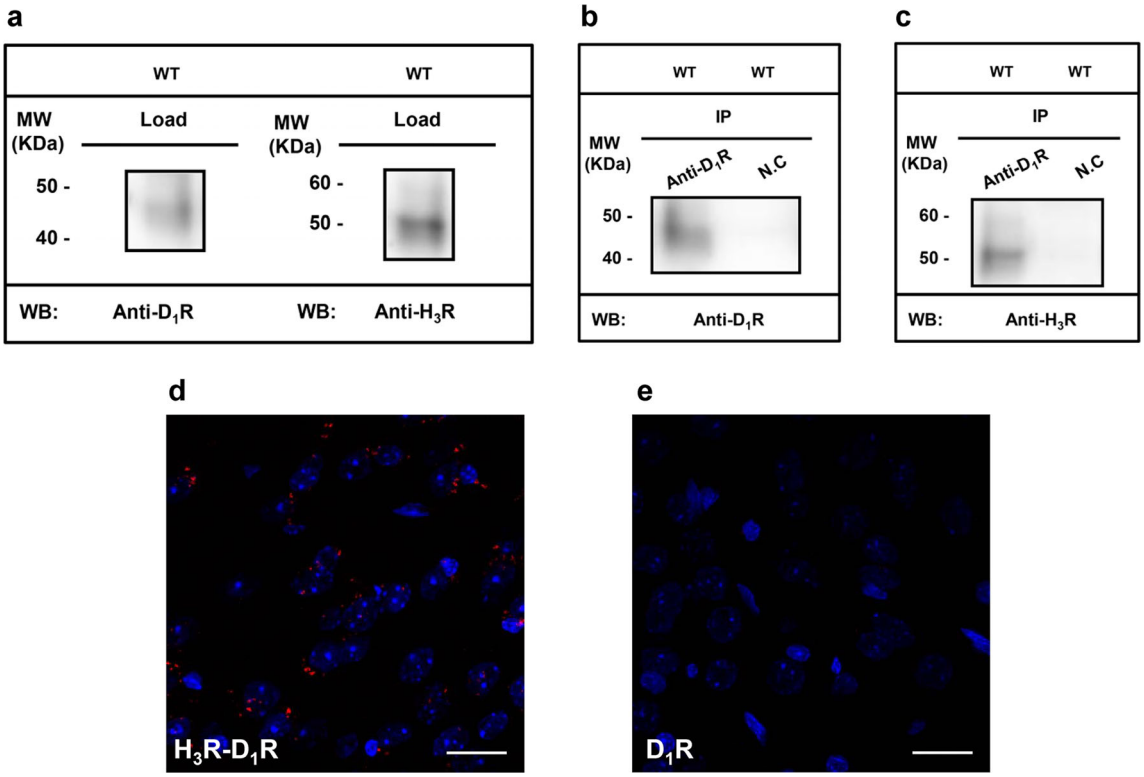


Fig. 1 Detection of D_1-H_3 receptor heteromers in samples from rat cortex. Co-immunoprecipitation experiments (**a**–**c**) and PLA (**d**, **e**) were performed in samples from rat cortex. Solubilized rat cortical membranes (**a**) and immunoprecipitates with anti-D_1 receptor or anti-calnexin antibodies as negative control (NC) (**b**, **c**) were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted using anti-D_1 or anti-H_3 receptor antibodies. *IP* immunoprecipitation, *WB* western blotting, *MW* molecular weight. PLA experiments were performed as indicated in "Materials and Methods" and D_1/H_3 receptor complexes (**d**) were visualized as red spots around blue-colored DAPI-stained nucleus; the negative control (**e**) was performed in sections incubated with one primary antibody (against the D_1 receptor). Scale bar: 20 μm

by Rluc or YFP and the whole open reading frame of D_1, H_3, or the NR1A subunit of NMDA receptors. Cells expressing the NR1A subunit fused to Rluc and D_1R-YFP provided a saturable BRET signal that proves the interaction between the two proteins (Fig. 4b). $BRET_{50}$ was 7.0 ± 0.7 mBU and $BRET_{max}$ was 51 ± 2 mBU (mean ± SD; n = 3–6). As the NR2B subunit is needed for surface expression of NMDA receptors, the experiment was repeated in cells expressing NR1A and NR2B subunits. BRET signal was saturable indicating that NR1A-Rluc does interact with D_1-YFP even in the presence of the third protein (Fig. 4c). $BRET_{50}$ was 20 ± 10 mBU and $BRET_{max}$ was 70 ± 20 mBU (mean ± SD; n = 3–6). Different $BRET_{50}$ values in the absence and presence of NR2B subunit indicate that the hetero-oligomer forms with a different affinity. BRET data using H_3 and NMDA receptors were qualitatively different. On the one hand, the NR1A-Rluc subunit did not provide specific BRET readouts when transfected with H_3-YFP receptors, i.e., the relationship with the acceptor/donor ratio was linear, thus suggesting a lack of interaction (Fig. 4d). On the other hand, BRET between NR1A-Rluc and H_3-YFP converted into saturable when the NR2B subunit was co-expressed (Fig. 4e). Taken together, data indicate that H_3 and D_1 receptors may form a complex with functional NR1A/NR2B NMDA receptors. Importantly, evidence for complexes having the three receptors was obtained by the dopamine-induced increase of $BRET_{max}$ between NR1A-Rluc and H_3-YFP (in the presence of D_1 and NR2B) (Fig. 4f). To know whether a macromolecular complex may include the four proteins, a BRET with bimolecular fluorescence complementation assay was performed. For complementation experiments, different ratios of plasmids encoding fusion proteins constituted by H_3 or D_1 receptors and one half of the YFP (H_3R-nYFP and D_1R-cYFP) were assayed to optimize fluorescence emission after complementation (ESM 1: Fig. S1a, b). The optimal cDNA ratio was 1.5 and 4 μg for, respectively, plasmids coding H_3R-nYFP or D_1R-cYFP (ESM 1: Fig. S1). The assayed negative controls were those constituted by non interacting pairs: serotonin $5HT_{2B}$ and H_3 receptors fused to, respectively, the C-terminal and N-terminal hemi-domains of YFP, or cannabinoid CB_1 and D_1 receptor fused to, respectively, the N-terminal and C-terminal hemi-domains of YFP (ESM 1: Fig. S1). Cells were then transfected with cDNAs encoding for NR1A-Rluc, NR2B, and H_3 and D_1 receptors fused to, respectively, the N-terminal and C-terminal hemi-domains of YFP. Complementation was confirmed by a saturable BRET signal

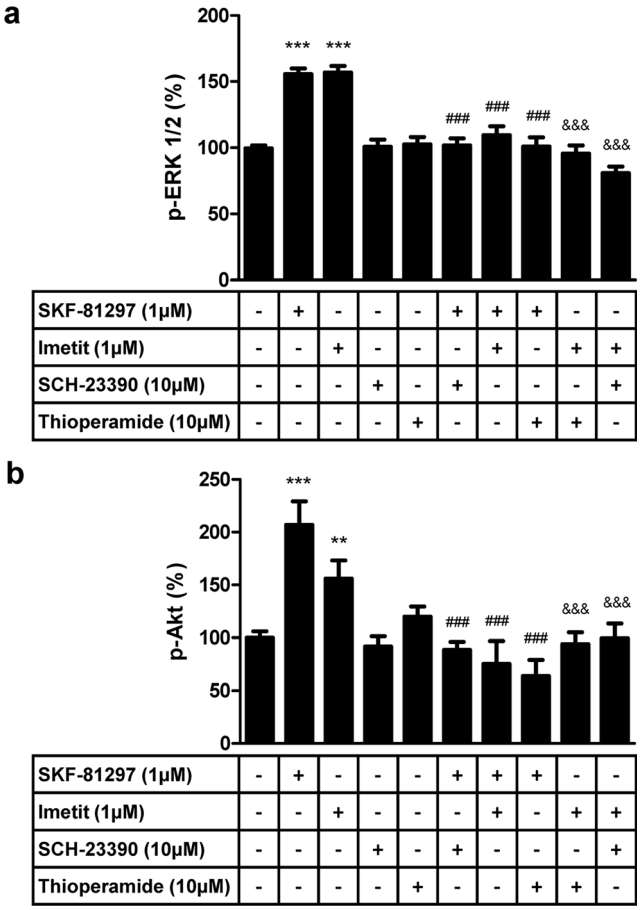


Fig. 2 **a**, **b** Signaling cross-talk and cross-antagonism on ERK 1/2 and Akt phosphorylation in rat cortical slices. Slices were preincubated with Krebs-bicarbonate buffer with/without antagonists (10 μM thioperamide or 10 μM SCH-23390) for 20 min prior to the addition of agonists (1 μM SKF-81297), followed by a further incubation of 10 min. ERK1/2 or Akt phosphorylation was determined as described in "Materials and Methods." For each treatment, immunoreactive bands from eight slices obtained in two different experiments from a total of ten animals were quantified, and values represent the mean ± SEM of the percentage of phosphorylation relative to basal levels found in untreated slices (100 %). Significant differences were calculated by one-way ANOVA with post hoc Bonferroni's test for multiple comparisons (***$p < 0.001$ compared with the control condition; $^{###}p < 0.001$ compared with SKF-81297 treatment; $^{&&&}p < 0.001$ compared with imetit treatment)

(Fig. 4h), thus demonstrating the formation of a macromolecular complex containing D_1, H_3, and NMDA receptors. The negative control in cells co-expressing CB_1R-Rluc, D_1R-cYFP, and H_3R-nYFP led to a linear non-specific BRET reflecting the inability of the cannabinoid CB_1 receptor to interact with D_1/H_3RHets (Fig. 4h).

In Vitro Neuroprotection

The effect on NMDA-mediated excitotoxicity of D_1 and H_3 receptor ligands was tested in slices from rat cortex. Images comparing Hoechst and propidium iodide labeling are shown in Fig. 5 (top). Quantification of dead versus total cells showed that NMDA but also SKF-81297, a full D_1 receptor agonist, were able to significantly induce cell death (Fig. 5, bottom). A selective NMDA antagonist, MK-801, partially reversed the SKF-81297-induced toxicity. The D_1 receptor selective antagonist, SCH-23390, and, interestingly, the selective H_3 receptor antagonist, thioperamide, were able to markedly reduce the toxicity induced by NMDA (Fig. 5, bottom).

Similar experiments were performed in slices from a transgenic model of Alzheimer's disease, namely the APP/PS1 mouse. Brain cortical slices from APP/PS1 and age-matched non-transgenic (wild-type) animals were treated with NMDA or SKF-81297 to provoke excitotoxic neuronal cell death. The two drugs led to a significant cell death in samples from the two animal groups that was prevented by 10 μM MK-810, the selective NMDA receptor antagonist. The antihistamine drug (10 μM thioperamide) also led to a significant prevention of excitotoxic damage. Neuroprotection was also afforded by thioperamide in samples from APP/PS1 animals treated with SKF-81297. In addition, the D_1 receptor selective antagonist SCH-23390 also counteracted the death induced by NMDA (Fig. 6a, b). Overall, neuroprotection data show the interplay between the three receptors and that antagonists may prevent excitotoxic neuronal death.

Expression of Heteromers in Cortex from APP/PS1 Mice

Unfortunately, there is not any reliable methodology to detect three interacting proteins in natural sources. Thus, the potential expression of macromolecular complexes in cortex was addressed by PLA assays aimed at detecting heteromers between pairs of proteins. Using combinations of antibodies, macromolecular complex expression was assayed in the cortex of wild-type and APP/PS1 mice, which exhibit an accelerated AD phenotype due to overexpression of the human amyloid precursor protein harboring the *Swedish* double mutation and of the presenilin-1 L166P mutant. Red dots reflecting positive PLA were observed in samples treated with antibodies against D_1 and H_3 receptors, with antibodies against D_1 and NR1A receptors and with antibodies against H_3 and NR1A. The number of red dots after PLA was negligible in the negative controls, obtained by doing the PLA experiments in wild-type and APP/PS1 mice brain sections only incubated with antibodies against D_1 (Fig. 7a, b) or against H_3 receptors (not shown). In cortical sections from wild-type mice, the percentage of cells expressing D_1-H_3, NMDA/NR1A-D_1, or NMDA/NR1A-H_3 complexes was similar; also similar were the dots/cell ratios (Fig. 7b, black bars). Although indirect, these PLA results constitute evidence that the three receptors form a macromolecular complex. The percentage of dimer-expressing cells was also similar in the cortex from the APP/PS1 mouse (Fig. 7b left, red bars) also suggesting the occurrence in the cortex of APP/

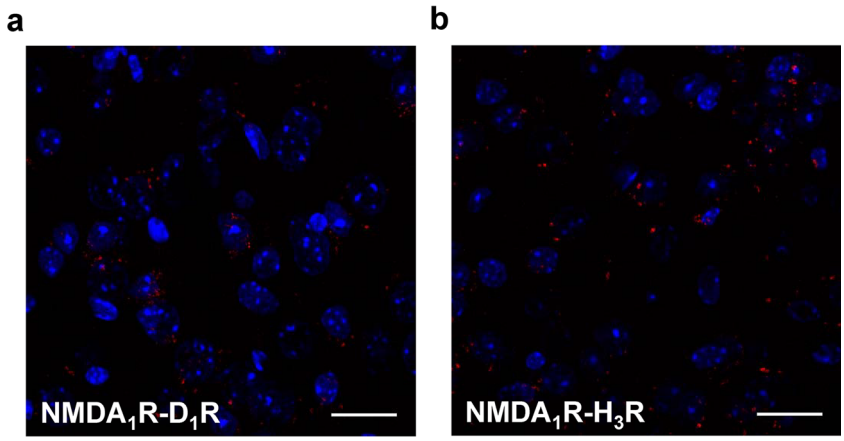


Fig. 3 Detection of NR1-D_1 and NR1-H_3 receptor complexes in rat cortex. PLA experiments were performed in rat cortical sections as indicated in "Materials and Methods." NMDA/NR1A-D_1 (**a**) and NMDA/NR1A-H_3 (**b**) receptor complexes were visualized as red spots around blue-colored DAPI-stained nucleus. Scale bar: 20 μm

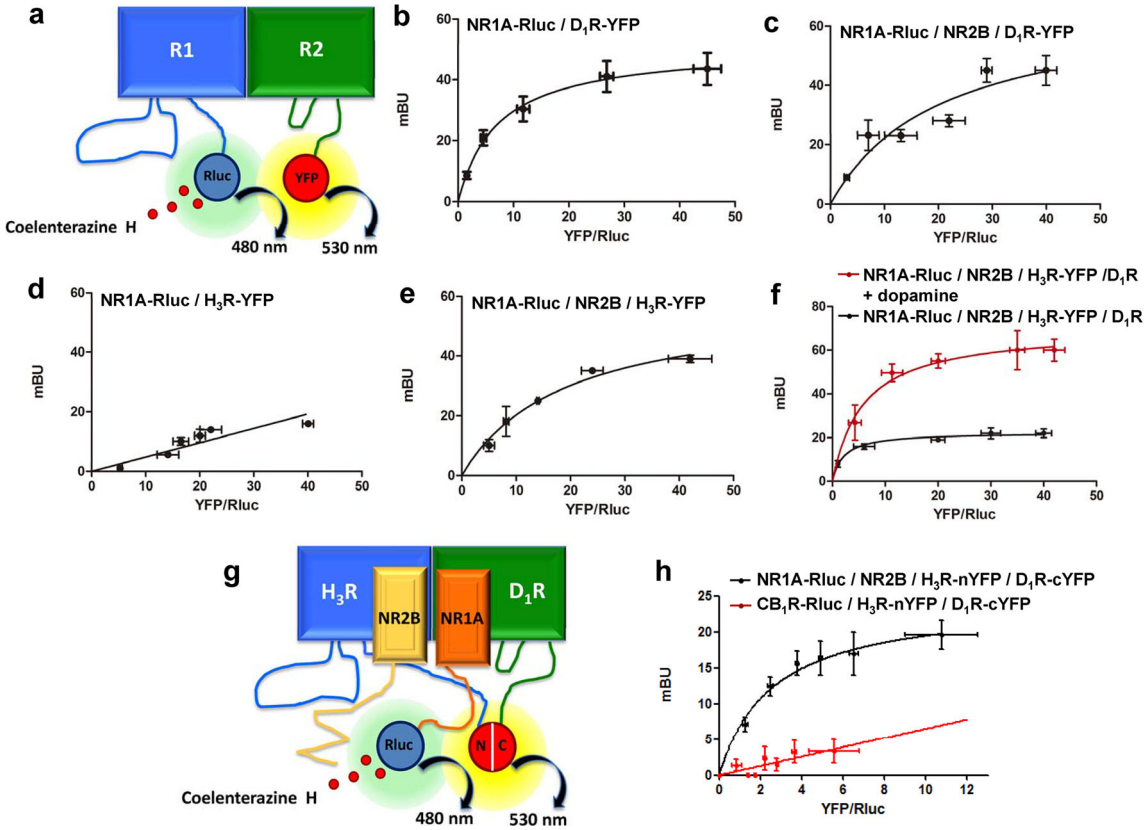


Fig. 4 Detection by energy transfer experiments of complexes formed by of NR1A and D_1 and H_3 receptors. **a** Scheme of the BRET technique. One receptor (R1) fused to Rluc (BRET donor) and a closely located receptor (R2) fused to YFP (BRET acceptor) allows, prior addition of a Rluc substrate, energy transfer, and fluorescence emission at 530 nm. **b**–**e** BRET saturation experiments were performed using HEK293 T cells 48 h post-transfection with 0.2 μg of cDNA for NR1A-Rluc with (**c**, **e**) or without (**b**, **d**) the same amount of cDNA for NR2B and increasing amounts of cDNA for to D_1R-YFP (0.5–4.5 μg cDNA) (**b**, **c**) or H_3R-YFP (0.5–4.5 μg cDNA) (**d**, **e**). **f** As in **e** but in cells also transfected with 2 μg of cDNA for D_1 receptors (full human version) and treated with 1 μM of dopamine. **g** Scheme of BRET combined with bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to detect D_1R-H_3R-NMDA receptor heteromers. In this assay, the BRET donor consists of Rluc fused to the NR1A NMDA receptor subunit (*orange*). The acceptor for BRET (YFP Venus) is reconstituted if H_3R (*blue*) fused to the N-terminal half of YFP is close to D_1R (*green*) fused to the C-terminal half of YFP Venus. **h** BRET with bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments were carried out 48 h post-transfection using 0.05 μg of cDNA for NR1A-Rluc and to NR2B (or 0.08 μg of cDNA for CB_1R-Rluc) and increasing amounts of cDNA for H_3R-nYFP (0.5–6 μg cDNA) and D_1R-cYFP (0.5–3 μg cDNA). Both fluorescence and luminescence of each sample were measured in every experiment to confirm similar donor expressions (~130,000 bioluminescence units) while monitoring the increase in acceptor expression (10,000–40,000 fluorescence units in BRET saturation experiments and 10,000–25,000 fluorescence units in BiFC experiments). The relative amount of BRET is given as a function of 100 × the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and donor (Rluc) expression. BRET and BiFC are expressed as milliBRET units (mBU) and values are the mean ± SEM from four to ten different experiments grouped as a function of the amount of acceptor

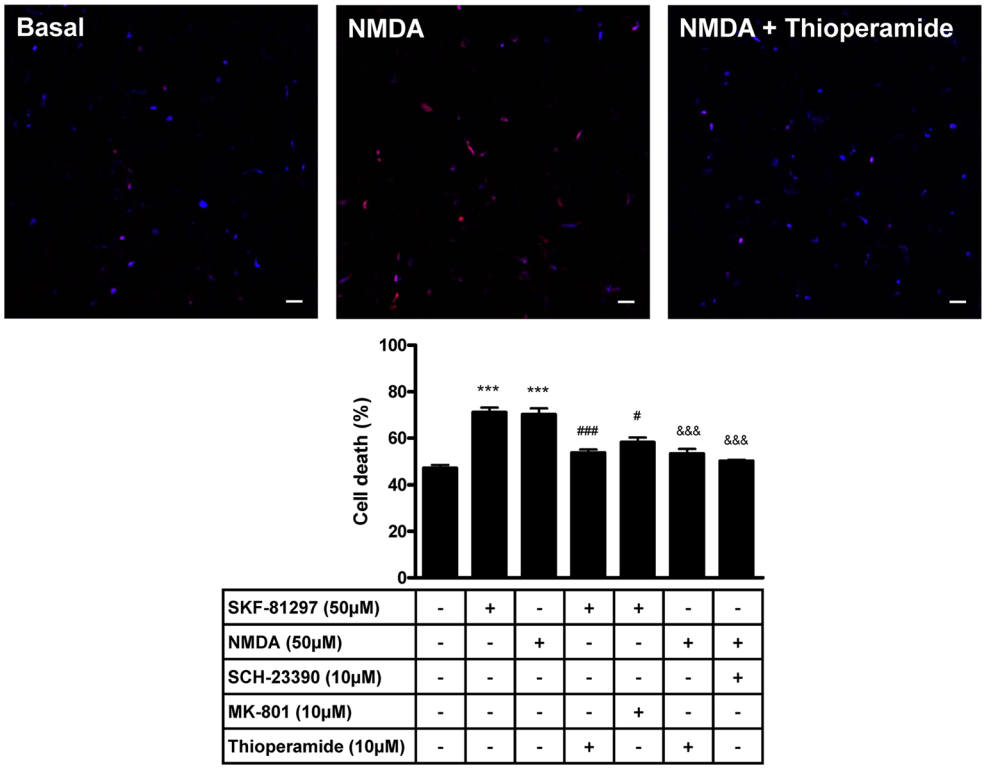


Fig. 5 Functional interactions between D_1, H_3, and NMDA receptors at the level of excitotoxic cell death in rat brain organotypic cultures. Organotypic cultures of rat cortical slices were prepared as indicated in "Materials and Methods." Twenty-four hours post-dissection, culture medium was replaced by fresh medium containing vehicle or 10 μM SCH-23390, MK-801, or thioperamide. Slices were incubated for 1 h before the addition of the D_1 receptor agonist SKF-81297 (50 μM) or NMDA (50 μM) and samples were maintained 48 h more in culture. Cell death was determined by comparing Hoechst and propidium iodide (PI) staining as indicated in "Materials and Methods." *Top*: Representative images of control (basal) and treated (NMDA and NMDA plus thioperamide) samples. *Bottom*: Values represent mean ± SEM of the percentage of PI-stained cells versus total Hoechst-stained cells (the 100 % value would represent complete cell death) determined in 10–12 fields from three independent organotypic cultures. Scale bar: 20 μm. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated ($^{***}p < 0.001$), SKF-81297-treated ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#\#}p < 0.001$), or NMDA-treated ($^{\&\&\&}p < 0.001$) cultures

PS1 animals of complexes formed by the two GPCRs and the NR1A subunit of the NMDA receptor. Differences in the labeling of the three different pair of proteins between wild-type and APP/PS1 animals were statistically significant but small in magnitude (circa 10 %). Thus, it may be assumed that the differences in the expression of complexes formed by the three proteins are low. Looking at red spots/cell ratios, the highest change in transgenic versus wilt-type animals is the expression of dimers formed by H_3 receptors and the NR1A subunit. Such increase correlated with a small increase in the ratio of D_1-NR1A pairs and a small increase in the ratio of H_3-NR1A pairs (Fig. 7b, right panel). These results highlight the occurrence in the cortex of the AD mouse of pairs of proteins, and allegedly of complexes of the three receptors, at levels comparable to those found in samples from wild-type animals. Due to the relevance of Aß peptide toxicity in Alzheimer's disease pathophysiology, we assayed whether the H_3 receptor antagonist could be neuroprotective against the toxic action of Aß. Images comparing Hoechst and propidium iodide labeling are shown in Fig. 8 (top), and the results showed that 10 μM thioperamide was totally effective in blocking the toxic effect of 1 μM $Aß_{1–42}$ peptide (Fig. 8, bottom). Similar effects were obtained with other selective H_3 receptor antagonists (not shown). Our results suggest hetero-oligomer formation in cortex from wild-type and APP/PS1 animals and show that antagonists of dopamine or of histamine receptors consistently afford neuroprotection against excitotoxic agents or $Aß_{1–42}$ peptide.

Discussion

Dopamine and NMDA receptor interactions have potential from a therapeutic point of view. A main issue on targeting post-synaptic receptors with agonist or antagonists is the alteration of important neural functions (reviewed in [25]). Activation of D_1 and NMDA receptors converge in the ERK1/2 MAP kinase cascade [33]. pERKs translocate to the

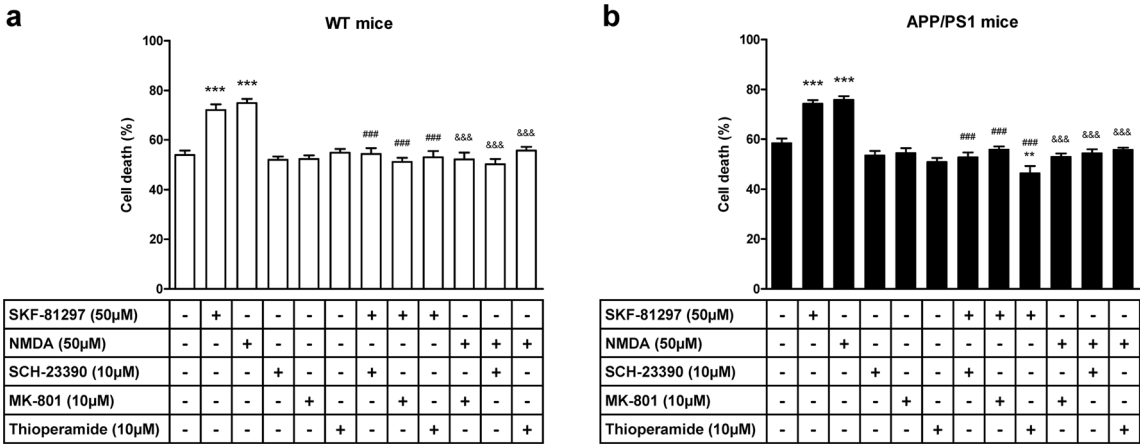


Fig. 6 Functional interactions between D_1, H_3, and NMDA receptors at the level of excitotoxic cell death in organotypic cultures from APP/PS1 and age-matched wild-type mice. Organotypic cultures of cortical slices from wild-type (**a**) and APP/PS1 (**b**) mice were prepared as indicated in "Materials and Methods." Cultures in fresh medium containing vehicle or 10 μM SCH-23390, MK-801, or thioperamide were then incubated for 1 h before the addition of the D_1 receptor agonist SKF-81297 (50 μM) or NMDA (50 μM) and samples were maintained 48 h more in culture. Cell death was determined by Hoechst and propidium iodide (PI) staining as indicated in "Materials and Methods." Values represent mean ± SEM of the percentage of PI-stained cells versus total Hoechst-stained cells (the 100 % value would represent all cell death) determined in 10–12 fields from three independent organotypic cultures. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated (***$p < 0.001$), SKF-81297-treated ($^{###}p < 0.001$), or NMDA-treated ($^{&&&}p < 0.001$) organotypic cultures. Two-way ANOVA showed no significant differences on comparing data from wild-type and APP/PS1 mice

nucleus and engage transcription factors involved in neural plasticity and survival or death mechanisms.

Neural cell toxicity by dopamine is mediated by both cell surface receptors [34, 35] and by intracellular metabolism leading to increased $NAD(P)^+$/NAD(P)H ratios (Giménez-Xavier et al. [36] and references therein, [37]). Toxic mechanisms include a dopamine-induced increase in cytosolic SULT1A1/3 sulfotransferase levels, the enzyme that metabolizes the neurotransmitter to dopamine-sulfate. Induction of sulfotransferases is preceded by dopamine-receptor-mediated ERK phosphorylation and inhibited by the D_1 receptor antagonist SCH-23390. Interestingly, induction of SULT1A1/3 requires NMDA receptor signaling thus suggesting a dopamine D_1-NMDA receptor-mediated mechanism [37].

The quaternary structure of receptor complexes is key for signaling to the MAP kinase cascade [38]. The NR1A and NR2A subunits of the NMDA receptor interact with two regions in the carboxyl tail of the D_1 receptor. Interestingly, one interaction is involved in modulating receptor-gated currents and the other in the attenuation of NMDA receptor-mediated excitotoxicity [24]. Our results suggest the formation of heteromers formed by D_1, H_3, and NR1A-NR2B NMDA receptors in which the quaternary structure of the complex allows close contacts between D_1 and H_3 receptors and the two NMDA receptor subunits. PLA studies in cortical sections from rats and mice, including the APP/PS1 transgenic line, showed aggregates formed by NMDA, D_1 and/or H_3 receptors that are suggestive of complexes formed by the three receptors. Indeed, in vitro assays using BRET and bimolecular fluorescence complementation constitute evidence of complexes containing D_1, H_3, and NR1A-NR2B NMDA receptors. Dopamine-induced increase of $BRET_{max}$ between NR1A-Rluc and H_3-YFP (in the presence of the NR2B subunit and the D_1 receptor) reflects the allosteric interactions expected when one receptor within the hetero-oligomer is activated. Alteration of the quaternary structure of the overall macromolecular complex by H_3 receptor antagonists seems to uncouple the death program induced by engagement of D_1 or NMDA receptors (Fig. 9). The protection afforded in rat cortical slices by the H_3 receptor antagonist, thioperamide, was virtually complete. It is worth noting that thioperamide in cortical slices from APP/PS1 mice reverted the excitotoxic shock. Although not statistically significant, there was a tendency of thioperamide decreasing the degree of death in APP/PS1 slices incubated with medium lacking any added compound. The neuroprotection exerted by thioperamide in wild-type and APP/PS1 mice was very similar, being this result consistent with the similar level of expression of D_1/H_3, D_1/NR1A, or H3/NR1A pairs of proteins in the cerebral cortex from both animal groups. Assessment of the degree of expression of complexes formed by the three (D_1, H_3, and NMDA) receptors cannot be direct. Hence, extrapolating the pairwise PLA results in Fig. 7, it is likely that the differences in percentage of cells or red spots/cell shown would account for a maximum difference of 10 % in the expression of triple complexes in AD versus wild-type mice.

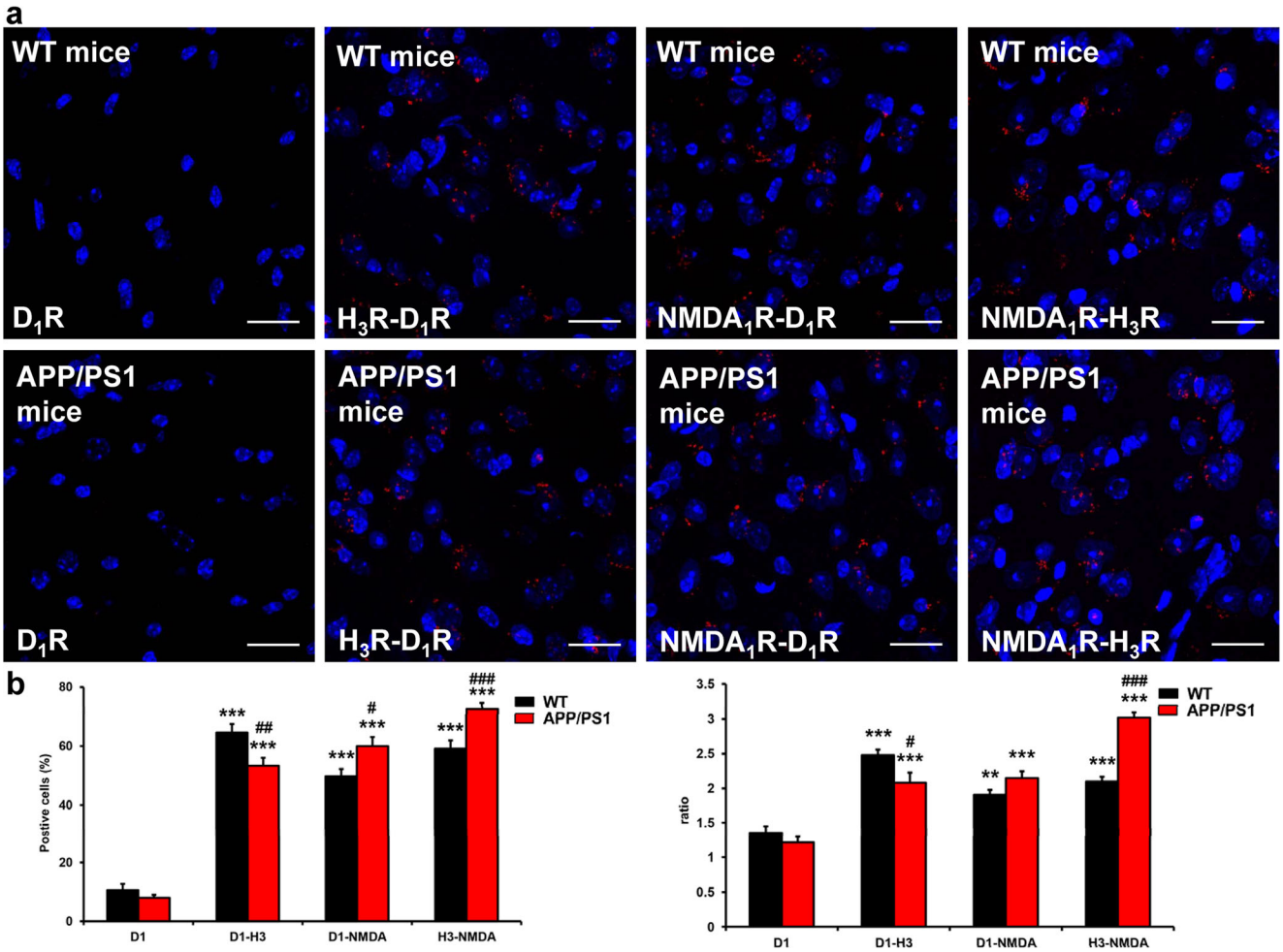


Fig. 7 Detection of D_1-H_3, NR1A-D_1, and NR1A-H_3 receptor complexes in APP/PS1 and age-matched wild-type mice. D_1-H_3, NR1A-D_1, and NR1A-H_3 receptor complexes were visualized by PLA as red spots around blue-colored DAPI-stained nucleus in cortical sections from wild-type (**a**, *top*) and APP/PS1 mice (**a**, *bottom*). As negative control (**a**, *left*), PLA experiments were performed in sections incubated with one primary antibody (against the D_1 receptor). Scale bar: 20 μm. In **b** (*left*), a graph shows the number of cells containing one or more red spots, expressed as a percentage respect the total number of cells (blue nucleus). The graph in the right shows *r* values (number of red spots/cell containing spots). Data are mean ± SEM of counts in 1000–2000 cells from 7–16 different fields from each condition from three different animals. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed significant differences (**$p < 0.01$, ***$p < 0.001$) on percentage of positive cells and ratio respect to negative control (D_1). Two-way ANOVA after Bonferroni's post hoc test comparing data from wild-type and APP-PS1 mice showed significant differences ($^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$) in percentage of cells expressing PLA for any protein pair, and in the number of spots/cell for D_1-H_3, ($^{\#}p < 0.05$) and NR1A-H_3 ($^{\#\#\#}p < 0.001$) but not for NR1A-D_1 heteroreceptor complexes

Remarkably, the evidence of marked D_1-H_3-NMDA receptor complex expression in mice exhibiting an accelerated AD phenotype due to overexpression of the human amyloid precursor protein make these complexes attractive to combat amyloid-related excitotoxic damage. The increased excitotoxic vulnerability by amyloid protein [39] and evidence of Aß binding to NMDA receptors [5, 40, 41], prompted the assay of Aß toxicity that was also prevented by thioperamide. Taken together, the results indicate a neuroprotective potential of H_3 receptor antagonists.

Passaia and Blandina [42] reviewed data suggesting modulation by histamine via H_3 receptors of cholinergic tone in the cortex and hippocampus and proposed the use of thioperamide as a potential pharmacological intervention to enhance cholinergic input in AD. To our knowledge, thioperamide has not been tested in AD animal models. However, recently released results from a 16-week phase II clinical trial in subjects with mild-to-moderate AD [43] show that a monotherapy with GSK239512, a safe and brain-penetrant selective H_3 receptor antagonist, improves episodic but not working memory or executive functions. Although the cognitive effects were virtually absent in these patients, the potential of H_3 receptor antagonists to prevent disease progression may not be underestimated, and our in vitro results show that H_3 receptor antagonism is very efficacious in preventing excitotoxicity and Aß peptide toxicity. What the results suggest is that H_3 receptor antagonists may not be

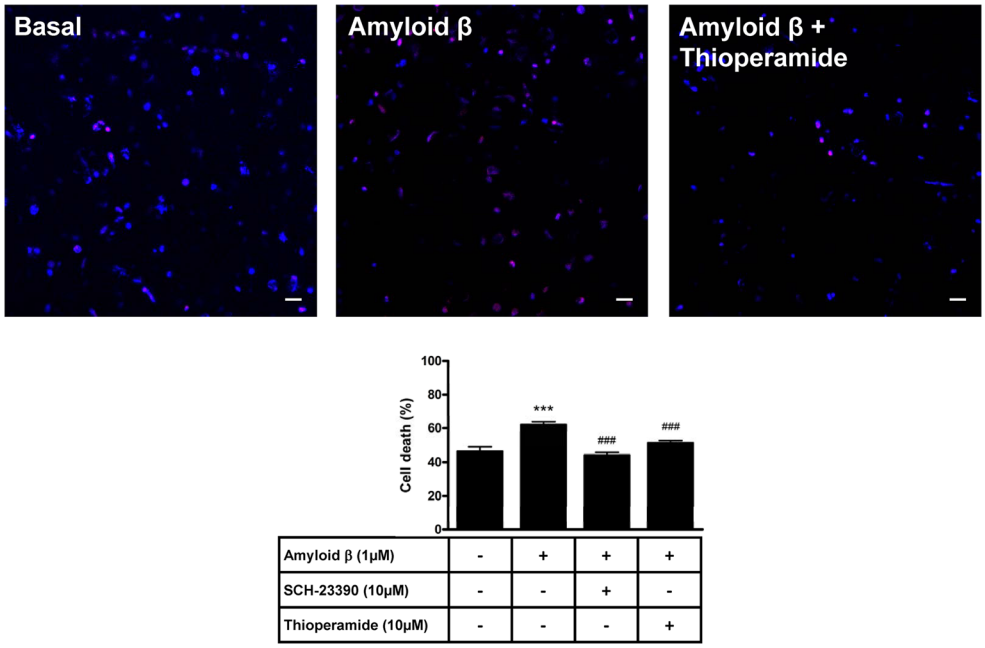


Fig. 8 $A\beta_{1–42}$ peptide-promoted cell death in rat brain organotypic cultures. Organotypic cultures of rat cortical slices were prepared as indicated in "Materials and Methods." Cultures in fresh medium containing vehicle or 10 μM of SCH-23390 or thioperamide were incubated for 1 h before the addition of $A\beta_{1–42}$ peptide (1 μM) and samples were maintained 48 h more in culture. *Top*: Representative images of control (basal), and treated ($A\beta_{1–42}$ peptide and $A\beta_{1–42}$ peptide plus thioperamide) samples. *Bottom*: Cell death was determined by Hoechst and propidium iodide (PI) staining as indicated in "Materials and Methods." Values represent mean ± SEM of the percentage of PI-stained cells versus total Hoechst-stained cells (the 100 % value would represent all cell death) determined in 10–12 fields from three independent organotypic cultures. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test showed a significant effect over vehicle-treated ($^{***}p < 0.001$) or $A\beta_{1–42}$ peptide-treated ($^{\#\#\#}p < 0.001$) organotypic cultures. Scale bar: 20 μm

suitable for what they have been tested until now, namely cognitive enhancement, but for neuroprotection, which is seemingly afforded by targeting H_3-D_1-NMDA receptor heteroreceptor complexes.

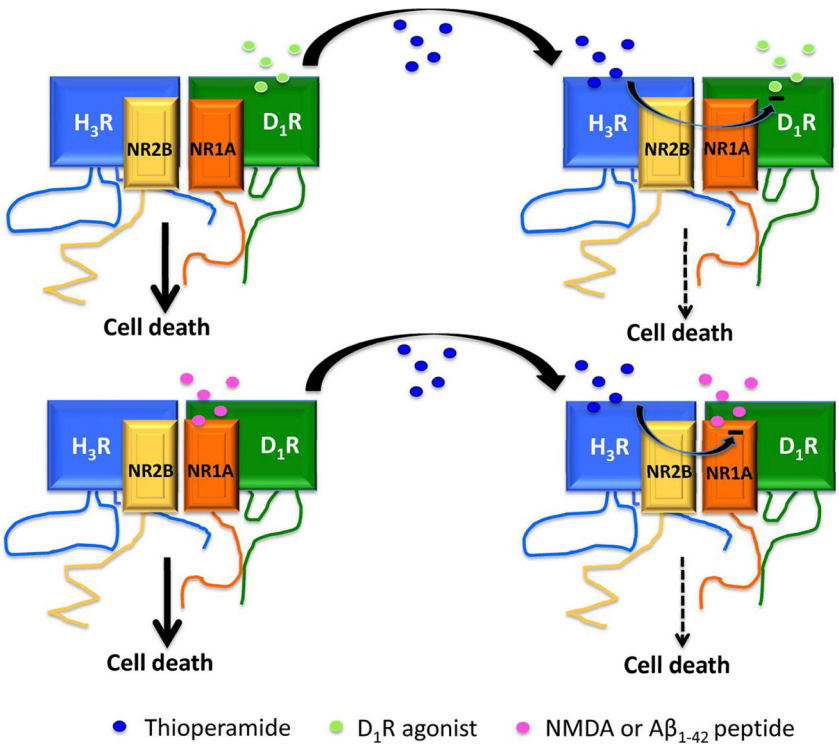


Fig. 9 Scheme depicting how complexes formed by NMDA, D_1, and H_3 modulate excitotoxic or $A\beta_{1–42}$ peptide-mediated cell death. Over stimulation of D_1R by the SKF-81297 agonist (*top panels*) induce cell death that can be reverted by H_3R antagonist thioperamide. Similarly, NMDA binding to its receptor, or $A\beta_{1–42}$ peptide, probably by binding to NMDA receptors (*bottom panels*), induce excitotoxic cell death that can be reverted by the H_3R antagonist, thioperamide. Neuroprotection seems to involve a cross-antagonism, i.e., thioperamide-counteracting D_1 or NMDA receptor overstimulation

Acknowledgments We would like to thank Prof. Isidre Ferrer and Dr. Ester Aso for kindly providing the APP/PS1 transgenic animals used in this work and Dr. Julie Perroy for kindly providing constructs encoding NMDA receptor subunits and fusion proteins containing NMDA receptor subunits.

Funding None of the authors have received compensation for professional services.

MRR had and has a predoctoral contract from the University of Barcelona. DMD had postdoctoral contracts from the Spanish Government. EM and GN had and have research fellow contracts from CIBERNED (Instituto Carlos III, Ministry of Health, Spanish Government). AC, JM, CL, EIC, VC, and RF had and have academic positions linked to the University of Barcelona.

Compliance with Ethical Standards Animal procedures were conducted according to ethical guidelines (European Communities Council Directive 2010/63/EU) and approved by the animal experimentation ethics committee of the Catalan Government (CEEA-DAAM 6419 and CEEA/DMAH 4049 and 5664).

Conflict of Interest This work was supported by grants SAF2009-07276 (RF) from Spanish Ministry of Economy and Innovation (MINECO), 2014-SGR-1236 (EIC) from *Generalitat de Catalunya* and 2140610 (EIC) from the *Fundació La Marató de TV3*. Some grants may include FEDER funds. PJM was supported by projects RYC-2009-05522, SAF2010-18472 and RG140118. Authors declare no conflict of interests.

References

1. Thathiah A, De Strooper B (2011) The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci 12:73–87. doi:10.1038/nrn2977
2. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB et al (1997) Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. J Neurosci 1762:10090–10101. doi:10.1523/JNEUROSCI.4147-13.2014
3. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB et al (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio *in vitro* and in vivo. Neuron 17:1005–13
4. Jürgensen S, Antonio LL, Mussi GEA et al (2011) Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. J Biol Chem 286:3270–6. doi:10.1074/jbc.M110.177790
5. Cowburn RF, Wiehager B, Trief E et al (1997) Effects of beta-amyloid-(25–35) peptides on radioligand binding to excitatory amino acid receptors and voltage-dependent calcium channels: evidence for a selective affinity for the glutamate and glycine recognition sites of the NMDA receptor. Neurochem Res 22:1437–42
6. Ferrada C, Moreno E, Casadó V et al (2009) Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br J Pharmacol 157:64–75. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00152.x
7. Moreno E, Vaz SH, Cai N-S et al (2011) Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. J Neurosci 31:7412–23. doi:10.1523/JNEUROSCI.0191-11.2011
8. Hersi AI, Richard JW, Gaudreau P, Quirion R (1995) Local modulation of hippocampal acetylcholine release by dopamine D1 receptors: a combined receptor autoradiography and in vivo dialysis study. J Neurosci 15:7150–7
9. Seong HJ, Carter AG (2012) D1 receptor modulation of action potential firing in a subpopulation of layer 5 pyramidal neurons in the prefrontal cortex. J Neurosci 32:10516–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.1367-12.2012
10. Mcnamara CG, Tejero-Cantero Á, Trouche S et al (2014) Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. Nat Neurosci 17:1658–60. doi:10.1038/nn.3843
11. Fernández-Novoa L, Cacabelos R (2001) Histamine function in brain disorders. Behav Brain Res 124:213–33
12. Cacabelos R, Yamatodani A, Niigawa H et al (1989) Brain histamine in Alzheimer's disease. Methods Find Exp Clin Pharmacol 11:353–60
13. Panula P, Rinne J, Kuokkanen K et al (1998) Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. Neuroscience 82:993–7
14. Mazurkiewicz-Kwilecki IM, Nsonwah S (1989) Changes in the regional brain histamine and histidine levels in postmortem brains of Alzheimer patients. Can J Physiol Pharmacol 67:75–8
15. Medhurst AD, Roberts JC, Lee J et al (2009) Characterization of histamine H3 receptors in Alzheimer's disease brain and amyloid over-expressing TASTPM mice. Br J Pharmacol 157:130–8. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00075.x
16. Pillot C, Heron A, Cochois V et al (2002) A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. Neuroscience 114:173–93
17. Bitner RS, Markosyan S, Nikkel AL, Brioni JD In-vivo histamine H3 receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease. Neuropharmacology 60:460–6. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.10.026
18. Brioni JD, Esbenshade TA, Garrison TR et al (2011) Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther 336:38–46. doi:10.1124/jpet.110.166876
19. Chazot PL (2010) Therapeutic potential of histamine H3 receptor antagonists in dementias. Drug News Perspect 23:99–103. doi:10.1358/dnp.2010.23.2.1475899
20. Franco R, Martínez-Pinilla E, Lanciego JLJL, Navarro G (2016) Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. Front Pharmacol In press:76. doi: 10.3389/fphar.2016.00076
21. Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Garriga P et al (2013) G protein-coupled receptor heterodimerization in the brain. Methods Enzymol 521:281–294. doi:10.1016/B978-0-12-391862-8.00015-6
22. Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M et al (2011) Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. J Biol Chem 286:5846–54. doi:10.1074/jbc.M110.161489
23. Fiorentini C, Gardoni F, Spano P et al (2003) Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem 278:20196–20202. doi:10.1074/jbc.M213140200
24. Lee FJS, Xue S, Pei L et al (2002) Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. Cell 111:219–30
25. Wang M, Wong AH, Liu F (2012) Interactions between NMDA and dopamine receptors: a potential therapeutic target. Brain Res 1476:154–63. doi:10.1016/j.brainres.2012.03.029
26. Wilkinson D, Wirth Y, Goebel C (2014) Memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: meta-analyses using

realistic definitions of response. Dement Geriatr Cogn Disord 37: 71–85. doi:10.1159/000353801
27. Wang D, Jacobs SA, Tsien JZ (2014) Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for treating or preventing age-related memory decline. Expert Opin Ther Targets 18:1121–30. doi:10.1517/14728222.2014.941286
28. Navarro G, Cordomí A, Zelman-Femiak M et al (2016) Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. BMC Biol 14:26. doi:10.1186/s12915-016-0247-4
29. Rodrigues RJ, Almeida T, Díaz-Hernández M et al (2016) Presynaptic P2X1-3 and α3-containing nicotinic receptors assemble into functionally interacting ion channels in the rat hippocampus. Neuropharmacology 105:241–257. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.01.022
30. Navarro G, Carriba P, Gandía J et al (2008) Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. ScientificWorldJournal 8:1088–97. doi:10.1100/tsw.2008.136
31. Navarro G, Moreno E, Aymerich M, et al. (2010) Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. Proc Natl Acad Sci U S A. doi: 10.1073/pnas.1008911107
32. Navarro G, Moreno E, Bonaventura J et al (2013) Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. PLoS One 8, e61245. doi:10.1371/journal.pone.0061245
33. Kaphzan H, O'Riordan KJ, Mangan KP et al (2006) NMDA and dopamine converge on the NMDA-receptor to induce ERK activation and synaptic depression in mature hippocampus. PLoS One 1, e138. doi:10.1371/journal.pone.0000138
34. Chen J, Rusnak M, Luedtke RR, Sidhu A (2004) D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. J Biol Chem 279:39317–30. doi:10.1074/jbc.M403891200
35. Jeon S-M, Cheon S-M, Bae H-R et al (2010) Selective susceptibility of human dopaminergic neural stem cells to dopamine-induced apoptosis. Exp Neurobiol 19:155–64. doi:10.5607/en.2010.19.3.155
36. Giménez-Xavier P, Gómez-Santos C, Castaño E et al (2006) The decrease of NAD(P)H has a prominent role in dopamine toxicity. Biochim Biophys Acta 1762:564–74. doi:10.1016/j.bbadis.2006.02.003
37. Sidharthan NP, Minchin RF, Butcher NJ (2013) Cytosolic sulfotransferase 1A3 is induced by dopamine and protects neuronal cells from dopamine toxicity: role of D1 receptor-N-methyl-D-aspartate receptor coupling. J Biol Chem 288:34364–74. doi:10.1074/jbc.M113.493239
38. Navarro G, Ferre S, Cordomi A et al (2010) Interactions between intracellular domains as key determinants of the quaternary structure and function of receptor heteromers. J Biol Chem 285:27346–27359. doi:10.1074/jbc.M110.115634
39. Koh JY, Yang LL, Cotman CW (1990) Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. Brain Res 533:315–20
40. Le WD, Colom LV, Xie WJ et al (1995) Cell death induced by beta-amyloid 1–40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. Brain Res 686:49–60
41. Wu J, Anwyl R, Rowan MJ (1995) Beta-amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. Neuroreport 6:2409–13
42. Passani MB, Blandina P (1998) Cognitive implications for H3 and 5-HT3 receptor modulation of cortical cholinergic function: a parallel story. Methods Find Exp Clin Pharmacol 20:725–33
43. Grove RA, Harrington CM, Mahler A et al (2014) A randomized, double-blind, placebo-controlled, 16-week study of the H3 receptor antagonist, GSK239512 as a monotherapy in subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 11:47–58

3.4 Modulación alostérica y funcional de receptores D_1 de dopamina mediante el direccionamiento farmacológico sobre receptores H_3 de histamina en el heterómero de receptores D_1-H_3

Mar Rodríguez-Ruiz, Antonio Castellanos-Martínez, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Enric I. Canela, Estefanía Moreno*, Vicent Casadó*

*Contribuyeron igualmente

Manuscrito preparado para su revisión en *Neuropharmacology, 2018*

Existen múltiples y robustas evidencias de la heteromerización entre el receptor de dopamina D_1 (D_1R) y el receptor de histamina H_3 (H_3R), aunque los mecanismos moleculares que subyacen a su modulación recíproca son poco conocidos. En este trabajo se han identificado ligandos de H_3R capaces de modular alostéricamente la unión de la dopamina al D_1R, concretamente en la unión de la dopamina al segundo protómero en el homodímero D_1R-D_1R que conforma el heterotetrámero D_1R-D_1R-H_3R-H_3R, el cual ha sido demostrado mediante ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET). Sorprendentemente, esta modulación ha resultado ser positiva, mientras que todos los ensayos funcionales muestran claramente una regulación negativa de H_3R sobre el D_1R, por lo que se ha propuesto como explicación más probable que la activación por dopamina del segundo protómero del homodímero D_1R-D_1R provoca una inhibición de la señalización, siempre que el primer protómero ya esté activado, tal y como ha sido descrito previamente para el receptor D_2R. Mediante ensayos de transferencia de energía por resonancia con complementación bioluminiscente (CODA-RET), se ha demostrado que bajo el heterómero D_1R-H_3R se encuentran pre-ensambladas una proteína Gαs y una proteína Gαi, se ha evidenciado la capacidad del D_1R de activar proteína Gαi de una forma específica de heterómero y a dosis elevadas de agonista y se ha comprobado que, en circunstancias de coactivación dopaminérgica e histaminérgica, ligandos selectivos de D_1R favorecen la activación de Gαi por parte de la histamina, mientras que ligandos selectivos de H_3R modulan negativamente la activación de Gαs inducida por dopamina. Mediante BRET por activación de proteína G, se ha comprobado que la histamina es capaz de activar todos los subtipos principales de proteína Gαi/o (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 y Gαi3) aunque con potencias ligeramente distintas, mientras que los agonistas de D_1R han mostrado una selectividad funcional al activar únicamente los subtipos Gαo2 y Gαi1 cuando el D_1R se encuentra formando heterómeros con el H_3R. La posibilidad de modular alostéricamente al D_1R con gran variedad de ligandos selectivos de H_3R, junto con un mayor conocimiento de la farmacología de ambos receptores a nivel de activación de distintos subtipos de proteína G, abre la posibilidad de un nuevo enfoque en el diseño de fármacos capaces de frenar la señalización del D_1R, el cual se encuentra sobreactivado en múltiples procesos patológicos como trastornos adictivos y desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington.

ALLOSTERIC AND FUNCTIONAL MODULATION OF DOPAMINE D_1 RECEPTORS BY TARGETING HISTAMINE H_3 RECEPTORS WITHIN THE D_1-H_3 RECEPTOR HETEROMER

Mar Rodríguez-Ruiz[1,2,3], Antonio Castellanos-Martínez[1,2,3], Josefa Mallol[1,2,3], Antoni Cortés[1,2,3], Sergi Ferré[4], Enric I. Canela[1,2,3], Estefanía Moreno[1,2,3]*, Vicent Casadó[1,2,3]*

Affiliations:

1 Molecular Neurobiology laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

2 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

3 Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

4 Integrative Neurobiology Section, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health (NIH), Triad Technology Building, 333 Cassell Drive, Baltimore, MD 21224, USA. Electronic address: sferre@intra.nida.nih.gov

*Equal contribution

FUNDINGS

This research was supported by the *Agustí Pedro i Pons University Foundation*

Corresponding authors:

Estefanía Moreno
estefaniamoreno@ub.edu
+34 934021213

Vicent Casadó
vcasado@ub.edu
+34 934021213

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona,
Av. Diagonal 643. Prevosti Building. 08028 Barcelona. Spain.

SUMMARY

Many and strong evidences have shown the existence of heteromers formed by dopamine D_1 (D_1R) and histamine H_3 (H_3R) receptors, although the exact molecular mechanisms underlying their reciprocal modulation are poorly understood. In the present work we have identified, by radioligand binding assays, H_3R selective ligands able to allosterically modulate the dopamine binding to D_1R, in particular its binding to the second protomer of the D_1R-D_1R homodimer within the D_1R-D_1R-H_3R-H_3R heterotetramer, which has been demonstrated by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) with bimolecular luminescent and fluorescent complementation assays. Importantly, this modulation has been shown to be positive, whereas all the functional assays show a clear negative regulation of H_3R over D_1R. For this reason, we have proposed as the most probable explanation that the activation by dopamine of the second protomer of the D_1R-D_1R homodimer causes a signaling inhibition as long as the first protomer has already been activated by the binding of another dopamine molecule, as it has been previously described for the D_2R. By complemented donor-acceptor resonance energy transfer (CODA-RET) we have proved that both Gαs and Gαi proteins are pre-coupled under the D_1R-D_1R-H_3R-H_3R heterotetramer, it has been evinced the D_1R ability to activate Gαi protein in a heteromer-specific manner and at high doses of agonist, and also, we have observed that in a situation of dopaminergic and histaminergic coactivation, D_1R selective ligands improve the Gαi activation by histamine, whereas H_3R selective ligands negatively modulate the Gαs activation by dopamine. Finally, by G-protein activation BRET assays we have demonstrated that histamine can activate all the main subtypes of Gαi/o protein (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 y Gαi3), although with slightly distinct potencies, whereas dopamine and D_1R selective ligands have shown functional selectivity activating only the Gαo2 and Gαi1 subtypes when D_1R is forming heteromers with H_3R. Thus, the possibility to allosterically modulate the D_1R with a broad variety of H_3R selective ligands, together with a greater knowledge of the pharmacology of both D_1R and H_3R at the level of activation of distinct subtypes of G protein, opens the possibility to a new perspective in the design of new therapeutic drugs able to dampens D_1R signaling, which has been found to be overactivated in multiple pathological processes as addictive and neurodegenerative disorders as Huntington's disease.

KEYWORDS

GPCR, G-protein-coupled receptor, heteromers, heteroreceptor complex, heterotetramer, dopamine receptor, histamine receptor, addiction, Huntington's disease

INTRODUCTION

Dopamine plays a key role in multiple and diverse biological processes, as memory consolidation, motor behavior, emotions or reward, and its signaling is known to be altered in many neurological diseases as depression, schizophrenia, drug addiction, Parkinson's or Huntington's disease, among others (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Iversen and Iversen, 2007). Dopamine receptors are G protein–coupled receptors (GPCR) that have been classified in two subfamilies according to their ligand recognition properties and their effects on cAMP production: the Gαs/olf-coupled D_1-like receptors, formed by D_1 and D_5 receptors (D_1R and D_5R) and the Gαi/o-coupled D_2-like receptors, comprising D_2, D_3, and D_4 receptors (D_2R, D_3R, and D_4R) (Beaulieu et al., 2015; Missale et al., 2010). Their differential distribution at cerebral and cellular level confers them the ability to regulate not only dopamine signaling but also signaling coming from other neurotransmitter systems. This is possible because of the demonstrated ability of GPCRs to interact and form oligomers with the same (homomers) or with other (heteromers) receptors, which can result in important changes in receptor compartmentalization, conformation and function (Ferré et al., 2014; J Gingell et al., 2016). The biochemical bases of these changes are allosteric modulations exerted between receptors, also known as lateral allosterism, which can be originated by the only physical interaction with the partner receptor and by the activation of the partner receptor (Ferré et al., 2014; Melancon et al., 2012; Smith and Milligan, 2010). Allosterism between receptors allows the cell to have a key and energy saving signaling regulation mechanism, as it takes place before of the downstream amplification.

Although physiological levels of dopamine has been reported to promote neuronal plasticity and to have a neuroprotective effect (Schapira, 2002; Yao et al., 2008), in some neurological disorders in which high dopamine levels are produced, apoptotic signaling cascades could be induced in postsynaptic neurons. It has been hypothesized that this mechanism could explain, at least in part, the striatal neurodegeneration observed in disorders like multiple-system atrophy or Huntington's disease (Hantraye, 1998). In particular, it has been suggested that the neurotoxic effects induced by dopamine would be produced by two different mechanisms: by the overstimulation of D_1R and by the autoxidation of dopamine to toxic metabolites (Chen et al., 2009; Wersinger et al., 2004). The maintained activation of D_1R causes a sustained p-ERK activation through the cAMP/PKA/Rap1/B-raf/MEK signaling pathway, in which the differential activation of MAPKs, JNK and p38 promote the cellular apoptosis (Chang and Karin, 2001).

D_1R has been detected forming heteromers with the histamine H_3 receptor (H_3R) (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011) and several studies demonstrate a functional negative regulation exerted by H_3R over D_1R, including preventing its apoptotic signaling, when both receptors are expressed postsynaptically (Alfaro-Rodriguez et al., 2013; Arias-Montaño et al., 2001; Moreno et al., 2014; Rodríguez-Ruiz et al., 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004). H_3R is a GPCR coupled to Gαi/o that is mainly expressed in the central nervous system, unlike the other existing histamine receptors H_1R, H_1R and H_4R. Histamine has shown an essential function modulating several biological processes that are also regulated by dopamine, as emotivity, motor behavior or cognitive processes, and the D_1R-H_3R interaction represents one of the molecular ways of co-regulation and integration of signaling in the shared neuronal pathways. In addition, it had been suggested that D_1-like agonists would be able to activate Gαi/o protein when this receptor is forming heteromers with H_3R, deduced from cAMP assays (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2014). One of the aims of the present work was to test this hypothesis by a high specific biophysical technique and to study the allosteric interactions between D_1R and H_3R at

the first level of receptor activation, that is at the level of ligand binding and G-protein activation.

The functional versatility of G-protein signaling relies on its heterotrimeric structure, formed by Gα, Gβ and Gγ subunits, and on the existence of multiple subtypes of each subunit (Wettschureck and Offermanns, 2005). Currently, there are increasing studies that propose the existence of pre-assembled receptor-G protein-adenylyl cyclase complexes, formed by the minimal structure composed of one GPCR homodimer, one heterotrimeric G protein and the adenylyl cyclase enzyme (Galés et al., 2006; Han et al., 2009; Navarro et al., 2018). Taking all this evidence into account, in this work we have analyzed the G-protein rearrangements following the activation of homomers and heteromers of D_1R and H_3R, with the aim of increasing the knowledge about their functional allosteric interactions and also to elucidate if there are binding preferences of these receptors for any of the five different Gαi/o protein subtypes analyzed (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3). It would be of special interest to expand our knowledge about which is their physiological function, since they display high sequence homology but knockouts of these subunits have shown unique abnormalities in their phenotype (Jiang and Bajpayee, 2009; Jiang et al., 2001), probably because they are interacting with different effectors and because of their differential tissue and cellular expression patterns (Liu et al., 1994; Wettschureck and Offermanns, 2005).

MATERIALS AND METHODS

cDNA constructs

Human H_3R isoform 445 was gently supplied by Rob Leurs laboratory from Vrije University, Amsterdam. For CODA-RET assays, H_3R-nRluc and H_3R-cRluc constructs were obtained subcloning this H_3R supplied construct into pcDNA3.1 expressing the amino acid residues 1-229 (nRLuc) and 230-311 (cRLuc) of the RLuc8 protein, respectively. D_1R-nRluc, D_1R-cRluc, human Gαi1-mVenus, untagged Gβ1 and Gγ2 subunits were used. For BRET with bimolecular luminescence and fluorescence complementation assays, D_1R-nRluc, D_1R-cRluc, H_3R-nYFP and H_3R-cYFP were used. For G-protein activation BRET assays, D_1R, H_3R, human Gαi/o subunits (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) fused to Rluc8, the $G\beta_1$ subunit and the $G\gamma_2$ subunit fused to mVenus were used.

Cell culture and transfection

SK-N-MC neuroblastoma cells were grown in Eagle's minimal essential medium, supplemented with 10% FBS, 50 units·mL-1 penicillin, 50 mg·mL-1 streptomycin, non-essential amino acids, 2 mmol·L-1 L-glutamine and 50 mg·mL-1 sodium pyruvate at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 to 80% confluence. To obtain the SK-N-MC cells stably expressing human H_3 and human D_1 receptors (SK-N-MC/D1H3), the SK-N-MC cells stably expressing the human H_3R (SK-N-MC/H3) (provided by Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C.) were grown to 30–40% confluence in 60 cm2 dishes in presence of 600 mg·mL-1 G418 (Invitrogen) and transfected with the cDNA corresponding to human D_1R using Lipofectamine™ 2000. SK-N-MC/D1H3 receptor cells were allowed to recover for 24 h before the addition of G418 and 300 mg·mL-1 hygromycin B (Invitrogen), and the colonies that survived selection were grown and tested by binding experiments and Western blotting.
Human embryonic kidney HEK-293T cells were maintained in culture with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100), and 5% heat-inactivated fetal bovine serum and kept in an incubator at 37°C and 5% CO_2. HEK-293T cells were transiently transfected with the

corresponding cDNA by the ramified polyethylenimine (PEI; Sigma) method (Ferrada et al., 2009; Navarro et al., 2010).

Radioligand Binding Experiments.

Radioligand binding experiments were performed in Neuroblastoma SK-N-MC cells stably expressing D_1R, (RT =0.15 pmol/mg protein) and H_3R (RT =1.25 pmol/mg protein) (SK-N-MC/D1H3). Cell suspensions were disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 7 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for two 5 s-periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a proteinase inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA). Membranes were obtained by centrifugation twice at 105.000 g for 45 min at 4°C. The pellet was stored at −80°C, washed once more as described above and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Membrane protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard.

Binding experiments were performed with membrane suspensions (0.2 mg of protein/mL) at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM $MgCl_2$. For competition-binding assays, membrane suspensions were incubated for 2 h with a constant free concentration of 1.35 nM of the D_1R antagonist [^{3}H]SCH 23390 and increasing concentrations of dopamine in the absence or presence of a fixed concentration of each H_3R ligand. For saturation-binding assays, membrane suspensions were incubated for 3 h at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM $MgCl_2$ with increasing concentrations of the D_1R antagonist [^{3}H]SCH 23390 or the H_3R agonist [^{3}H]RAMH. Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM of the non-radiolabeled [^{3}H]SCH 23390 antagonist or [^{3}H]RAMH agonist.

In all cases, free and membrane-bound ligands were separated by rapid filtration of 500 μL aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C filters embedded in 0.3% polyethylenimine that were subsequently washed for 5 s with 5 mL of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer. The filters were incubated with 10 mL of Ultima Gold MV scintillation cocktail (PerkinElmer, Boston, MA, USA) overnight at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 2800 scintillation counter (PerkinElmer, Boston, MA, USA) with an efficiency of 62% (Sarrió et al., 2000).

Binding data analysis

Data were analyzed according to the 'two-state dimer model' of Casadó et al. (2007). The model assumes GPCR dimers as a main functional unit and provides a more robust analysis of parameters obtained from saturation and competition experiments with orthosteric ligands, as compared with the commonly used 'two-independent-site model' (Casadó et al., 2007; Ferré et al., 2014). In competition experiments the model analyzes the interactions of the radioligand with a competing ligand and it provides the affinity of the competing ligand for the first protomer in the unoccupied dimer (K_{DB1}), the affinity of the competing ligand for the second protomer when the first protomer is already occupied by the competing ligand (K_{DB2}) or the radioligand (K_{DAB}) and an index of cooperativity of the competing ligand (D_{CB}). A positive or negative value of D_{CB} implies either an increase or a decrease in affinity of K_{DB2} versus K_{DB1} and its absolute value provides a measure of the degree of increase or decrease in affinity.

Radioligand competition curves were analyzed by nonlinear regression using the commercial Grafit curve-fitting software (Erithacus Software, Surrey, UK), by fitting the binding data to the mechanistic two-state dimer receptor model, as described in detail elsewhere (Casadó et al., 2009). To calculate the macroscopic equilibrium dissociation constants from competition experiments, the following general equation must be applied: $A_{bound} = (K_{DA2}\ A + 2A^2 + K_{DA2}\ A\ B / K_{DAB})\ R_T / (K_{DA1}\ K_{DA2} + K_{DA2}\ A + A^2 + K_{DA2}\ A\ B / K_{DAB} + K_{DA1}\ K_{DA2}\ B / K_{DB1} + K_{D\,A1}\ K_{DA2}\ B^2 / (K_{DB1}\ K_{DB2}))$, where B represents the assayed competing compound concentration and *R*T is the total amount of receptor dimers. Because the radioligand *A* ([^{3}H]RAMH or [^{3}H]SCH 23390)

showed non-cooperative behaviour (Casadó et al., 2007; Franco et al., 2006), Eqn 1 was simplified to Eqn 2 due to the fact that $K_{DA2} = 4K_{DA1}$, $K_{DB2} = 4K_{DB1}$ and $K_{DAB} = 2K_{DB1}$: $A_{bound} = (4K_{DA1} A + 2A^2 + 2K_{DA1} A B / K_{DB1}) R_T / (4K_{DA1}^2 + 4K_{DA1} A + A^2 + 2K_{DA1} A B / K_{DB1} + 4K_{DA1}^2 B / K_{DB1} + K_{DA1}^2 B^2 / K_{DB1}^2)$.

DMR Dynamic mass redistribution

A global cell signaling profile or DMR was measured using an EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). This label-free approach uses refractive waveguide grating optical biosensors, integrated into 384-well microplates. Changes in local optical density are measured in a detection zone up to 150 nm above the surface of the sensor. Cellular mass movements induced upon receptor activation are detected by illuminating the underside of the biosensor with polychromatic light and measured as changes in the wavelength of the reflected monochromatic light. These changes are a function of the refraction index. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) is directly proportional to the amount of DMR. Briefly, SK-N-MC cells expressing D_1R, H_3R or both receptors were resuspended and seeded at a density of 10,000 cells per well in 384-well sensor microplates in 30 µl growing media plus G418 and hygromycin B and cultured for 24 h at 37°C and 5% CO_2, to obtain monolayers at 70%–80% confluency. Before starting the assay, cells were washed twice with assay buffer (MEM supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.15, 0.1% DMSO and 0.1% BSA) and incubated 2 h in 40 µl per well in the reader at 24°C. Hereafter, the sensor plate was scanned, and a baseline optical signature was recorded for 10 min before adding 10 µl of the agonist/s was added and recorded for 30 min. Kinetic results were analyzed using EnSpire Workstation Software v 4.10.

BRET with bimolecular luminescent and fluorescent complementation assays

Cells were transiently co-transfected with polyethylenimine with a constant amount of expression vectors encoding for D_1R-nRluc and D_1R-cRluc and with increasing amounts of the expression vectors corresponding to H_3R-nYFP and H_3R-cYFP (see Supplementary Figure 4 legend). Cells were harvested, washed, and resuspended in PBS. For determining reconstituted Venus expression, 20 µg of protein were distributed in 96-well plates (black plates with a transparent bottom) and the emission at 530 nm after the excitation at 500 nm with a Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) was quantified. Protein fluorescence expression was determined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing the receptors fused to nRLuc and cRLuc. In parallell, luminescence and BRET signal was determined as the ratio of the light emitted by Venus (530 nm) over that emitted by coelenterazine H (485 nm) 1 min after the addition of 5 µM coelenterazine H (Invitrogen) using a Mithras LB940. To quantify receptor-RLuc expression, luminescence readings were also performed after 10 min of adding coelenterazine H. The net BRET was defined as [(long-wavelength emission) / (short-wavelength emission)]-cf.], where cf. corresponds to [(long-wavelength emission) / (short-wavelength emission)] for the receptor– RLuc expressed alone in the same experiment. BRET is expressed as milliBRET units (mBU; net BRET 1000). Data were fitted to a nonlinear regression equation, assuming a single-phase saturation curve with GraphPad Prism 5 software.

CODA-RET

HEK-293T cells were co-transfected with human Gαi1-mVenus, untagged Gβ1 and Gγ2, and the pair of receptors of interest fused to the corresponding RLuc8 hemiprotein using polyethylenimine in a 1:2 ratio in 100-cm^2 cell culture plates. All experiments were performed approximately 48-hours after transfection. Cells were harvested, washed and resuspended in phosphate-buffered saline. Approximately 200,000 cells/well were distributed in 96-well plates, and agonists were added two minutes after the addition of 5 µM Coelenterazine H to each well.

Antagonists were added 10 minutes before coelenterazine H. The fluorescence of the acceptor was quantified (excitation at 500 nm and emission at 540 nm for 1-second recordings) in Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) to confirm the constant expression levels across experiments. In parallel, the BRET signal from the same batch of cells was determined as the ratio of the light emitted by mVenus (530 nm) over that emitted by RLuc (485 nm). G protein-activation was calculated as the BRET change (BRET ratio for the corresponding drug minus BRET ratio in the absence of the drug) observed 10 minutes after the addition of the ligands. E_{MAX} values were expressed as the percentage of the effect of each ligand over the effect of dopamine or histamine depending on the experiment. Data were fitted to a nonlinear regression equation, assuming a single-phase dose-response curve with GraphPad Prism 5 software. The transfected amount and ratio among the receptor and heterotrimeric G proteins were tested for optimized dynamic range in drug-induced BRET.

G-protein activation BRET assays

BRET assays were performed to detect receptor ligand induced events of activation of distinct subtypes of Gi/o protein, transfecting expression vectors coding for RLuc8-fused Gαi/o protein subunit and mVenus-fused Gγ2 protein for BRET pair, together with the receptor/s of interest and untagged Gβ1 constructs. As reported previously (Sánchez-Soto et al., 2016), cells were harvested, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline. Approximately 200,000cells/well were distributed in 96-well plates, and 5 μM coelenterazine H (substrate for luciferase) was added to each well. Two minutes after the addition of coelenterazine H, agonists were added to each well, whereas antagonists were added 10 min before coelenterazine. The fluorescence of the acceptor was quantified (excitation at 500 nm and emission at 540 nm for 1-s recordings) in Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) to confirm the constant expression levels across experiments. In parallel, the BRET signal from the same batch of cells was determined as the ratio of the light emitted by mVenus (530 nm) over that emitted by RLuc (485 nm). G protein activation was calculated as the BRET change (BRET ratio for the corresponding drug minus the BRET ratio in the absence of the drug) observed 10 min after the addition of the ligands. BRET curves were analyzed by nonlinear regression using the commercial Prism 5 (GraphPad Software).

Statistical Analysis

Data are presented as the mean ± S.E.M. and significance was analyzed by non-paired, two-tailed Student's t test, One-way or Two-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's or test (see figure legends) for multiple comparisons. Significant differences were considered when $p < 0.05$. For binding experiments, goodness of fit was tested according to reduced c2 value given by the non-linear regression program. The test of significance for two different model population variances was based upon the *F*-distribution (see Casadó *et al.*, 1990, for details). Using this *F*-test, a probability greater than 95% ($P < 0.05$) was considered the criterion to select a more complex model (cooperativity) over the simplest one (non-cooperativity). In all cases, a probability of less than 70% ($P > 0.30$) resulted when one model was not significantly better than the other

RESULTS

H_3R ligands can allosterically modulate dopamine binding affinity to D_1R

To assess if ligand binding on H_3R is able to allosterically modulate the D_1R, presumably by the previously reported direct interactions between these receptors (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011), we performed competitive radioligand assays. To do this, we first obtained a

neuroblastoma cell line (SK-N-MC) stably expressing D_1R (RT =0.15 pmol/mg protein) and H_3R (RT= 1.25 pmol/mg protein), both showing high affinity for their selective radioligand ($K_{D1(SCH23390)}$= 0.14 ± 0.02 nM and $K_{D1(RAMH)}$=0.11 ± 0.02), as determined by saturation binding curves (Supplementary Figure 1A and B, respectively). In this cell line, the amount of D_1R was around 8-fold lower than that of the H_3R, to favor the formation of D_1R-H_3R heteromers over D_1R-D_1R homomers and avoiding thus the masking of possible allosteric modulations exerted by H_3R. Next, to be sure that both receptors were functional and correctly expressed in this cell line, we detected their activation profiles by a DMR label-free assay, which allows the detection of changes in local optical density due to cellular mass redistribution induced upon receptor activation, reflecting primarily the G protein-dependent signaling (see the *Materials and Methods* section). Both the H_3R-selective agonist RAMH and the D_1-like selective agonist SKF 81297 were able to activate cellular signaling in the SK-N-MC cell line expressing both H_3R and D_1R, although with a different profile due to their different Gα-protein subunit activation (Gαi and Gαs, respectively) and because of their different expression amounts (Supplementary Figure 2A). As a control of the specificity of these responses, SK-N-MC cells stably expressing only D_1R or only H_3R were not able to induce cellular signaling when were activated by agonists of H_3R or D_1R, respectively (Supplementary Figure 2B and C). Furthermore, we could detect a reciprocal inhibition between D_1R and H_3R when double-transfected cells were activated simultaneously with agonists of both receptors, as co-treatments showed a smaller activation compared to the theoretical sum of both receptors activated separately (Supplementary Figure 2A). This mutual inhibition or negative crosstalk represents the previously reported molecular fingerprint of the D_1R-H_3R heteromer (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011), so that the DMR results confirm not only the correct functionality of both receptors, but also their functional heteromeric interactions in this cell line.

Finally, we used this stably transfected cell line to identify possible allosteric modulations exerted by H_3R over the D_1R. We analyzed if any H_3R ligand was able to modify the binding properties of dopamine to the D_1R by competitive radioligand assays, applying a fixed concentration of the tritium-labeled D_1R antagonist ^{3}H-SCH 23390 and increasing concentrations of non-labeled dopamine, in the absence or presence of a fixed concentration of non-labeled H_3R ligands. From the competition curves obtained and fitted accordingly to a two-state dimer model previously developed (Casadó et al., 2007), we calculated the K_{DB1} and K_{DB2} values of dopamine among all displacement curves (Table 1, Supplementary Figure 3). K_{DB1} and K_{DB2} values are the affinity constants corresponding to the dopamine binding to the first and the second protomer, respectively, of the D_1R-D_1R homodimer within the D_1R-D_1R-H_3R-H_3R heterotetramer, which in turns has been proved to exist by BRET with bimolecular luminescent and fluorescent complementation saturation assay (Supplementary Figure 4). We compared K_{DB1} and K_{DB2} values with those obtained adding only dopamine as a competitor (control) and it was observed that almost all H_3R ligands caused an effect, exerting their main allosteric modulations over the K_{DB2} values of dopamine, which suffered important decreases and, in some cases, even showed the disappearance of the negative cooperativity of dopamine. In particular, the H_3R ligands that have shown the most significative positive allosteric modulations are the agonists imetit and RAMH and the antagonists A331440 and VUF4904, which have exhibited a 58-, 18-, 44- and 137-fold decrease with respect to the K_{DB2} constant displayed by dopamine alone as a competitor. These results can be interpreted as a positive allosteric modulation by H_3R ligands over dopamine binding to D_1R, although since this binding is occurring on the second protomer in the D_1R-D_1R homodimer of D_1R-H_3R heteromers, at the level of effector coupling it could imply a negative effect on D_1R signaling, as it has been described for the D_2R (Han et al., 2009).

To be sure that the observed changes in K_{DB2} values are a result of an allosteric modulation due to conformational changes transmitted from one receptor to another and not because of a cross-

reactivity of H_3R ligands acting on the ortosteric site of D_1R, or conversely, we analyzed the already performed competition radioligand assays (Supplementary Figure 3), confirming that any of the H_3R ligands at the concentrations tested was able to compete with ^{3}H-SCH 23390 in the absence of dopamine, and we also performed new competition assays using ^{3}H-RAMH, an H_3R selective agonist, confirming also that neither dopamine nor D_1-like selective ligands were able bind to H_3R (Supplementary Figure 1C) and that there is no cross-reactivity between ligands of D_1R and H_3R receptors.

Allosteric modulations at the level of G-protein activation in the D_1R-H_3R heteromer

As allosteric modulations between protomers of a dimer occurs not only at the pharmacological level but also at the level of effector activation (Han et al., 2009), we performed CODA-RET (*COmplemented Donor-Acceptor Resonance Energy Transfer*) assays to study possible modulations between D_1R and H_3R at the level of G-protein activation. This technique combines the protein complementation with the resonance energy transference and implies the dimerization of two receptors, each one fused to one complementary half of the *Renilla luciferase 8* (Rluc). Upon dimerization and substrate addition, the reconstructed Rluc will be able to transfer luminescence energy to the mVenus fluorescent protein fused to a Gα subunit (see *Materials and Methods* section and Yano et al., 2017). In these assays we used HEK-293T cells, as they do not express significantly detectable levels of dopamine nor histamine receptors (Atwood et al., 2011) and can be efficiently transfected with multiple cDNA constructs. To functionally characterize a set of ligands and to check for possible changes in their potency or efficacy due to allosteric modulations between protomers, cells were transfected with different combinations of receptors (D_1RnRluc + D_1RcRluc, H_3RnRluc + H_3RcRluc and D_1RnRluc + H_3RcRluc) and Gαs, Gαi1 or Gαq subunits, always co-transfected with the brain widely expressed Gβ1 and Gγ2 subunits. Despite it is well recognized that D_1R couples to Gαs and H_3R to Gαi, which causes the canonical activation and inhibition of the adenylyl cyclase enzyme, respectively, the subtype of Gα protein that binds to the D_1R-H_3R heteromer was not so evident and was previously proposed to be Gαi (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011). Hence, we first performed experiments with each homomeric system, so that we could have a control of the proper functioning of the transfected cellular systems and confirm the Gα subunit associated with each receptor, by a high specific biophysical technique. As expected, dopamine and D_1-like selective agonists in the D_1R-D_1R homomeric system promoted the activation of Gαs protein (Figure 1A and Table 2), whereas H_3R agonists in the H_3R-H_3R homomeric system promoted the activation of Gαi (Figure 1B and Table 3). Both cellular systems allowed the pharmacological characterization of the agonists by their potencies and relative efficacies (to the endogenous ligand), both obtained after processing BRET ratio values from a ligand-induced concentration-dependent response. To ensure that the detected conformational changes in G-proteins were induced by the specific activation of each receptor, we performed experiments activating with increasing doses of receptor-specific antagonists/inverse agonists, alone or before the activation with fixed amounts of agonists of the same receptor (Supplementary Figure 5). The increasing curves show the dose-dependent G-protein activation induced by increasing amounts of each agonist applied alone, whereas the decreasing curves show the fully inhibition by antagonists of the G-protein activation induced by a fixed dose of agonist, which point out the receptor-specificity of G-protein activations. Considering the H_3R, the H_3R agonists activations not seem to be completely counteracted by VUF5681, but this is because of the observed weak partial agonism displayed by this antagonist. In addition, the decreasing curve obtained when the H_3R inverse agonist thioperamide was applied alone denotes the previously reported constitutive activity of H_3R (Arrang et al., 2007; Morisset et al., 2000; Rouleau et al., 2002) and the D_1R has

also shown its previously reported low constitutive activity (Cai et al., 1999; Tiberi and Caron, 1994; Tumova et al., 2004) when increasing doses of clozapine were applied.

Surprisingly, with the D_1R-H_3R heteromeric combination, D_1R agonists (Figure 2A, 2B) but no antagonists (Figure 2C, 2D) have shown their ability to activate both Gαs and Gαi protein subunits, although the latter only at very high D_1-like agonist concentrations, bringing to light that the D_1R-H_3R heteromer can differentially activate both subtypes of G protein. The Gαi activation induced by D_1R-agonists in the heteromeric complex is very likely to occur as an outcome of their binding to D_1R and the consequent allosteric modulation over H_3R (transactivation), since this Gαi activation caused by D_1-like agonists is not observed when cells are transfected with either D_1R-D_1R or H_3R-H_3R homomeric complexes along with Gαi (Supplementary Figure 6) and because D_1-like agonists cannot bind to H_3R (Supplementary Figure 1C). Although D_1-like agonists can activate both Gαs and Gαi proteins in the D_1R-H_3R heteromeric cellular system, it seems not to be the case for H_3R agonists, as we did only observe Gαi but not Gαs protein activation (Table 2, Figure 3). This effect of H_3R agonists on Gαi activation is exclusively mediated by the H_3R in the D_1R-H_3R heteromer, as histamine cannot activate Gαi in the D_1R-D_1R complex system (Supplementary Figure 6A). Furthermore, when cells were treated simultaneously with selective ligands of both receptors in the D_1R-H_3R heteromeric system, all D_1-like agonists increased the potency of histamine and the H_3R agonist RAMH in its coupling to Gαi (Figure 4A, 4B), whereas all H_3R agonists reduced the potency of dopamine and the D_1-like agonist SKF81297 to couple to Gαs (Figure 4C, 4D), favoring in both cases the G-protein signaling towards that mediated by H_3R and revealing the existence of allosteric modulations in both directions.

In addition, we compared results from each homomeric system with those from the heteromeric complexes to analyze if there are differences in the potency or relative efficacy (to the endogenous ligand) of agonists only because of the presence of the partner heteroreceptor in the complex. It was observed that the potency activating the D_1R-H_3R heteromer was 2-, 4- and 2-fold reduced for dopamine, SKF81297 and SKF77434, respectively, but it was 4- and 10-fold increased for SKF38393 and SKF83959, respectively, which however showed a significantly reduced efficacy, in relation with the D_1R-D_1R homomer (Table 2). On the other hand, all the tested H_3R agonists showed an increased potency (between 2 and 3,5-fold) activating the D_1R-H_3R heteromer in comparison with the H_3R-H_3R homomer, whereas their relative efficacies did not significantly change (Table 3). These results again point out the existence of allosteric modulations between D_1R and H_3R because of their heteromerization, which occur even without the co-activation of the partner receptor in the complex.

Taking all CODA-RET results into account, H_3R activation seems to be favoured by the interaction and by the activation of the D_1R, while on the contrary, D_1R activation has less potency when it is interacting with H_3R and even less when H_3R is also activated, besides the ability of D_1R agonists to activate Gαi at high concentrations when D_1R is interacting with H_3R. It is noteworthy that SKF38393 and SKF83959 have shown a different profile than the rest of D_1R agonists, exhibiting an increased potency and a drastically diminished relative efficacy when targeting the D_1R-H_3R heteromer, compared to its action on the D_1R-D_1R homomer. However, these apparent improvements in potency of SKF38393 and SKF83959 may derive from inaccurate values due to their low efficacy, which in any case would have a functional consequence in the same direction, that is a weakened signaling by D_1R when it is interacting with H_3R.

Finally, since it has been previously described that D_1R activation can trigger cellular calcium mobilization in a cAMP-independent manner and in fact exists a controversy about the ability of this receptor to activate or not Gαq protein (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Mahan et al., 1990;

Pedersen et al., 1994; Wang et al., 1995), we wanted to use a receptor-specific technique as CODA-RET to confirm or dismiss this possibility and to assess what happens under D_1R-H_3R heteromerization. We did not obtain any sign of activation by neither D_1R-D_1R, H_3R-H_3R nor D_1R-H_3R complexes, so we have demonstrated that, at least in this cellular system, D_1R cannot activate Gαq protein alone nor when it is interacting with H_3R, and we have also ratified that H_3R neither (data not shown).

Biased signaling at the level of Gαi protein activation

Owing to the existence of multiple subtypes of Gαi proteins (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) we wanted to elucidate if the H_3R presents an activation preference for any specific Gαi subunit subtype and if this property is different in the presence of the D_1R. By the G-protein activation BRET assay (see *Materials and Methods*), we transfected HEK-293T cells with the Gαi subunit subtype of interest fused to Rluc8, the Gβ1 subunit and the Gγ2 subunit fused to mVenus, along with the H_3R and/or the D_1R. In this assay, when a ligand induces the activation of the heterotrimeric G protein, the resulting conformational changes turn into negative BRET signal changes, in agreement with the opening and distancing between the Gαi and Gγ2 subunits. Regarding the activation by H_3R ligands, histamine has shown its highest potency activating Gαo1 and its lowest activating Gαi2 and Gαi3, either when it was targeting systems transfected with D_1R and H_3R or only with H_3R (Figure 5, Table 4). In general, the order of potencies is maintained among the H_3R agonists tested (EC_{50}: immepip≤imetit<RAMH<histamine) for each Gαi subtype, although there are slight variations for imetit and immepip when comparing systems transfected with D_1R and H_3R or only with H_3R, which suggests that they are due to allosteric modulations by D_1R. Specifically, when D_1R is not co-transfected with H_3R, imetit shows an opposite profile to the rest of H_3R agonists tested, histamine included, as it has a higher potency activating Gαi2 and Gαi3, whereas when D_1R and H_3R are co-transfected imetit shows its lowest potency with the Gαi2 subunit. For its part, immepip shows its highest potency for Gαo2 and Gαi1 activating the H_3R alone and its lowest for Gαi1 when D_1R is also present.

When we compare potencies of H_3R ligands by this technique between systems transfected only with H_3R and with both D_1R and H_3R, although the observed differences are likely due to the presence of D_1R, we can only consider them as a tendency, not only because they are not statistically significant, but also because the stoichiometry of homomers versus heteromers in the co-transfected systems cannot be controlled. Although the receptor levels are similar in both homomeric and heteromeric systems (data not shown), part of the signaling can come from homomeric receptor complexes and in different proportions, which would mean that the effect of the D_1R heteromerization with H_3R could be masked, at least partially.

Since we had detected by CODA-RET the ability of D_1R agonists to promote Gαi1 activation when D_1R is forming heteromers with H_3R, we wanted to test if it is also happening with the rest of Gαi subtypes. We observed that treatment with high doses of the tested D_1R agonists (dopamine, SKF81297 and SKF38393) can activate Gαi1 and Gαo2, but not Gαo1, Gαi2 or Gαi3, when both D_1R and H_3R are transfected (Figure 6), whereas these activations are not observed when the only receptor transfected is D_1R (Supplementary Figure 7). These results are in agreement with those observed by CODA-RET for the Gαi1 subunit activation and suggests a possible functional selectivity of D_1R agonists, in this case at the level of Gαi/o-protein subtype activation and also because of the D_1R-H_3R heteromerization.

DISCUSSION

Biophysical and structural studies have revealed that GPCRs can exhibit multiple conformations, of which some are pharmacologically silent, some are active and some can be partially active (Gurevich and Gurevich, 2017; Kenakin and Miller, 2010; Yao et al., 2009). Allosteric modulation of GPCRs, which can be afforded by ligand binding to allosteric sites of the receptor or by its direct interaction with other cytosolic or membrane proteins, can cause minor changes in receptor conformation (as small as 1 Å) that can affect receptor activity in a positive, negative or neutral direction (Kenakin, 2009; Melancon et al., 2012). In fact, the allosterically modulated receptors can be considered as new entities with new potential activity. Oligomerization of GPCRs, either by homo- or heteromerization of two or more entities, represents an important cell-signaling regulation mechanism based on direct allosteric interactions that can be detected by both the simple receptor interaction or the co-activation of receptors (Smith and Milligan, 2010). This work provides more evidence for the heteromerization of D_1R and H_3R and for the existence of allosteric modulations between them, with possible important functional consequences.

Since CODA-RET assay is a technique that necessarily requires the dimerization of two receptors for the complementation of the luminescence signal, we have a high control of which are the receptor species that take part in the energy transfer (Urizar et al., 2011). That means that when we analyze a heterodimer by this technique, measurements will not be contaminated by homomeric signaling complexes nor by downstream cross-talk, as they cannot contribute to the energy transfer. Furthermore, it is important to highlight that the high BRET-ratio raw values obtained in CODA-RET experiments when ligands are not present, as a consequence of energy transference, indicate that G-proteins are already bound to receptors and, thus, the observed increase in BRET signal after agonist addition and data processing accounts for a spatial rearrangement of the activated heterotrimeric G protein. This observation is in agreement with the previously demonstrated existence of preassembled receptor-G protein-adenylyl cyclase complexes, in which after agonist binding the receptor suffers a conformational change that causes a rearrangement between Gα, Gβ and Gγ subunits, resulting in the opening of the Gβ-Gγ interface but without their dissociation of the complex (Galés et al., 2006; Navarro et al., 2018).

Up to now, it had been proposed that D_1R-H_3R heteromer can activate Gαi protein by the treatment with D_1-like agonists (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011, 2014), which has been also confirmed by this technique, although at higher D_1-like agonist concentrations than for Gαs. Our CODA-RET results suggest that this is likely to occur by a transactivation mechanism induced by allosteric interactions between protomers, as we have detected that each receptor in the D_1R-H_3R heteromer maintain its canonical G-protein signaling (although with differences in potency and efficacy compared to homomeric complexes due to allosteric interactions), and D_1-like agonists cannot activate Gαi protein through the D_1R-D_1R nor the H_3R-H_3R homomers. In addition, we have verified by BRET with bimolecular luminescent and fluorescent complementation assay that the D_1R-H_3R heteromer can present a tetrameric structure formed by two homodimers of each receptor, suggesting that it would be possible that both Gαs and Gαi protein subtypes are bound to the heterotetramer, probably one under each receptor homodimer, as this has been the G protein-receptor stoichiometry proposed for other GPCRs according to structural modeling studies (Navarro et al., 2016, 2018). The possibility of a heterotetrameric structure along with CODA-RET results support this hypothesis but, nevertheless, it could also be possible that D_1R homodimer in the D_1R-H_3R heteromeric complex could bind not only to Gαs but also to Gαi, as a consequence of being forming complexes with H_3R, so that it is necessary to perform molecular modeling studies to depict which is the most probable distribution.

In addition to allosteric changes induced by direct receptor-receptor interactions, the activation of one receptor has shown to cause important affinity and functional changes in the partner heteroreceptor. As it has been shown by radioligand binding experiments, pharmacologically there is an improvement of the dopamine binding to D_1R when H_3R is co-activated, although this positive allosteric modulation exerted by H_3R ligands mainly affects the dopamine binding to the second protomer of the D_1R-D_1R homodimer in the D_1R-D_1R-H_3R-H_3R heterotetramer, as in displacement curves the K_{DB2} has been the mainly affected constant. On the contrary, changes in activation potencies from CODA-RET assays show that, functionally, the co-activation turns into a weakening of the D_1R signaling and a strengthening of that from H_3R. According to these results, allosteric modulations over D_1R induced by H_3R ligands binding to H_3R cause, on the one hand, important modifications in the ortosteric site of D_1R that involves an improvement of dopamine binding to the second protomer of the D_1R-D_1R homodimer only if the first protomer is also occupied by another dopamine molecule, and, on the other hand, conformational changes in the cytoplasmic region of D_1R that worsens its potency activating Gαs protein. Although at the level of dopamine binding there is a positive allosteric modulation, the physiological result of the activation of the second protomer of the D_1R-D_1R homodimer probably can result in a inhibition of the signaling, as it has been reported to be the case for the D_2R-D_2R homodimer (Han et al., 2009). Han et al. proved that, while inverse agonists binding to the second protomer causes increases in signaling, the binding of agonists decreases it, and they propose that the functionality of GPCR dimers can be physiologically modulated by the activation state of the second protomer, which besides represents a new therapeutic strategy to consider. On the whole, the heteromer-specific results obtained from CODA-RET and radioligand binding experiments reflect the existence of allosteric interactions between both receptors that could explain, at least in part, the *in vivo* observed effects when both receptors are activated, as the ability of D_1-like ligands to decrease cellular cAMP levels and the H_3R-ligands ability to negatively modulate D_1R signaling (Ellenbroek, 2013; Moreno et al., 2011, 2014; Rapanelli, 2017; Rodríguez-Ruiz et al., 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004).

Although it has been previously reported that D_1R activation can trigger cellular calcium mobilization in a cAMP-independent manner, we have confirmed that this would not be happening through Gαq activation. In fact, recent studies point to the D_5R as the main mediator of the Gαq signaling *in vivo* and suggest that D_1R would probably need to interact with other proteins/receptors to be able to activate Gαq proteins (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Beaulieu et al., 2015). Regarding H_3R calcium signaling inhibition, it is known to happen through the inhibition of type N and type P/Q channels by Gβγ subunits (Ikeda and Dunlap, 1999; Smrcka, 2008; Takeshita et al., 1998) and to be responsible of the presynaptic inhibition exerted by H_3R, so we did not expect a Gαq protein activation by this receptor, but we did neither observe an inhibition. In addition, it can also be possible that the D_1R and H_3R direct interaction with calcium channels, as the glutamate NMDAR (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004; Rodríguez-Ruiz et al., 2016), could mediate some of their calcium responses *in vivo* in those neurons where they are co-expressed.

The complexity of GPCRs signaling opens the possibility that the distinct Gαi protein subtypes (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) have different affinities for the H_3R and also for this receptor when it is assuming different conformations as a result of distinct ligands binding or because of its interaction with other proteins or receptors. By G-protein activation BRET assays, we have provided evidence of the H_3R ability to activate all subtypes of Gαi protein and we have described the potency profiles not only of histamine but also of selective synthetic H_3R agonists. The fact that the Gαi subtypes show a differential distribution at tissue and cellular level (Wettschureck and Offermanns, 2005) and that the distinct generated KO have shown unique deficiencies (Jiang et al., 2001), support the idea that each Gαi subtype has a distinct biological

function and are not simple isoforms. The capacity of H_3R to activate all Gαi subtypes confers on this receptor the ability to induce G-protein signaling in all those neurons where these subunits are expressed, and the observed differences in histamine potency (with its highest potency for Gαo1 and its lowest for Gαi2 and Gαi3) may possibly become determinant *in vivo*. Regarding D_1R, we have detected a biased activation of Gαi subtypes by this receptor, as we have detected its ability to activate Gαo2 and Gαi1 (which was also detected by CODA-RET), whereas it has never shown Gαo1, Gαi2 or Gαi3 activation. Furthermore, the differential potency profile exhibited by H_3R and the biased activation profile for the distinct Gαi subtypes shown by D_1R could explain the observed differences in D_1R-H_3R allosteric modulations between different cell types and neurons, although a deeper study of the cerebral distribution of these Gαi/o subunits is needed, which would in turn allow the therapeutic application of certain ligands selective for the heteromer and/or for the Gαi/o subtype of interest to be modulated.
In summary, our results demonstrate that receptor heteromerization and the consequent derived allosteric modulations between protomers can lead to a functional reciprocal regulation and even to the appearance of new biochemical properties, as changes in ligand binding affinity or the ability to activate new proteins, as it was the case for D_1R and the Gαi1 and Gαo2 protein subtypes. It is noteworthy that the functional selectivity displayed by D_1-like agonists activating only two Gαi subtypes in the D_1R-H_3R heteromeric complex would be a result of receptor heteromerization and that downstream cross-talks can be discarded at this level. Thus, taking into account the importance of receptor heteromerization and, given the chance to allosterically modulate a heteromeric complex, we consider that the design of new drugs and its pharmacological analysis should be developed considering the opportunity to act selectively on heteromeric complexes rather than directly to homomeric receptors. In particular, the possibility to allosterically modulate the D_1R in the D_1R-H_3R heteromer with broad variety of H_3R selective ligands, opens the possibility to a new perspective in the design of new therapeutic drugs able to dampens D_1R signaling, which has been found to be overactivated in multiple pathological processes as addictive and neurodegenerative disorders as Huntington's disease.

REFERENCES

Alfaro-Rodriguez, A., Alonso-Spilsbury, M., Arch-Tirado, E., Gonzalez-Pina, R., Arias-Montaño, J.-A., and Bueno-Nava, A. (2013). Histamine H3 receptor activation prevents dopamine D1 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. Neurosci. Lett. *552*, 5–9.

Arias-Montaño, J.A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., and Young, J.M. (2001). Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutryic acid from rat striatal slices. Br. J. Pharmacol. *133*, 165–171.

Arrang, J.-M., Morisset, S., and Gbahou, F. (2007). Constitutive activity of the histamine H3 receptor. Trends Pharmacol. Sci. *28*, 350–357.

Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. BMC Genomics *12*, 14.

Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol. Rev. *63*, 182–217.

Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., and Gainetdinov, R.R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. Br. J. Pharmacol. *172*, 1–23.

Cai, G., Gurdal, H., Smith, C., Wang, H.Y., and Friedman, E. (1999). Inverse agonist properties of dopaminergic antagonists at the D(1A) dopamine receptor: uncoupling of the D(1A) dopamine receptor from G(s) protein. Mol. Pharmacol. *56*, 989–996.

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

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature *410*, 37–40.

Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P.J., and Sidhu, A. (2009). Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. Eur. J. Neurosci. *29*, 287–306.

Ellenbroek, B.A. (2013). Histamine H_3 receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. Br. J. Pharmacol. *170*, 46–57.

Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., et al. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *157*, 64–75.

Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. Pharmacol. Rev. *66*, 413–434.

Franco, R., Casadó, V., Mallol, J., Ferrada, C., Ferré, S., Fuxe, K., Cortés, A., Ciruela, F., Lluis, C., and Canela, E.I. (2006). The two-state dimer receptor model: a general model for receptor dimers. Mol. Pharmacol. *69*, 1905–1912.

Galés, C., Van Durm, J.J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 778–786.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2017). Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. Nat. Chem. Biol. *5*, 688–695.

Hantraye, P. (1998). Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. Nucl. Med. Biol. *25*, 721–728.

Ikeda, S.R., and Dunlap, K. (1999). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. *33*, 131–151.

Iversen, S.D., and Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. Trends Neurosci. *30*, 188–193.

J Gingell, J., Simms, J., Barwell, J., Poyner, D.R., Watkins, H.A., Pioszak, A.A., Sexton, P.M., and Hay, D.L. (2016). An allosteric role for receptor activity-modifying proteins in defining GPCR pharmacology. Cell Discov. *2*, 16012.

Jiang, M., and Bajpayee, N.S. (2009). Molecular Mechanisms of Go Signaling. Neurosignals *17*, 23–41.

Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Wang, Y., and Birnbaumer, L. (2001). Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3577–3582.

Kenakin, T.P. (2009). '7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. Trends Pharmacol. Sci. *30*, 460–469.

Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. Pharmacol. Rev. *62*, 265–304.

Lee, F.J.S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X., and Liu, F. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. Cell *111*, 219–230.

Liu, Y.F., Jakobs, K.H., Rasenick, M.M., and Albert, P.R. (1994). G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G0 and Gi2 in GH4C1 pituitary cells. J. Biol. Chem. *269*, 13880–13886.

Mahan, L.C., Burch, R.M., Monsma, F.J., and Sibley, D.R. (1990). Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca2+ mobilization in Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 2196–2200.

Melancon, B.J., Hopkins, C.R., Wood, M.R., Emmitte, K.A., Niswender, C.M., Christopoulos, A., Conn, P.J., and Lindsley, C.W. (2012). Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. J. Med. Chem. *55*, 1445–1464.

Missale, C., Fiorentini, C., Collo, G., and Spano, P. (2010). The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. J. Recept. Signal Transduct. Res. *30*, 347–354.

Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepúlveda, M., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P.J., Canela, E.I., et al. (2011). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. J. Biol. Chem. *286*, 5846–5854.

Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ1-D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 3545–3558.

Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. Nature *408*, 860–864.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 18676–18681.

Navarro, G., Cordomí, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., et al. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. BMC Biol. *14*, 26.

Navarro, G., Cordomí, A., Casadó-Anguera, V., Moreno, E., Cai, N.-S., Cortés, A., Canela, E.I., Dessauer, C.W., Casadó, V., Pardo, L., et al. (2018). Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. Nat. Commun. *9*, 1242.

Pedersen, U.B., Norby, B., Jensen, A.A., Schiødt, M., Hansen, A., Suhr-Jessen, P., Scheideler, M., Thastrup, O., and Andersen, P.H. (1994). Characteristics of stably expressed human dopamine D1a and D1b receptors: atypical behavior of the dopamine D1b receptor. Eur. J. Pharmacol. *267*, 85–93.

Pei, L., Lee, F.J.S., Moszczynska, A., Vukusic, B., and Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 1149–1158.

Rapanelli, M. (2017). The magnificent two: histamine and the H3 receptor as key modulators of striatal circuitry. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *73*, 36–40.

Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., et al. (2016). Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. Mol. Neurobiol.

Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). Histamine H3-receptor-mediated [35S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *135*, 383–392.

Sánchez-Lemus, E., and Arias-Montaño, J.-A. (2004). Histamine H3 receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. Neurosci. Lett. *364*, 179–184.

Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N.S., Ellenberger, M.P., Newman, A.H., Ferré, S., and Yano, H. (2016). Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. Mol. Pharmacol. *89*, 457–466.

Schapira, A.H.V. (2002). Neuroprotection and dopamine agonists. Neurology *58*, S9-18.

Smith, N.J., and Milligan, G. (2010). Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. Pharmacol. Rev. *62*, 701–725.

Smrcka, A.V. (2008). G protein βγ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *65*, 2191–2214.

Takeshita, Y., Watanabe, T., Sakata, T., Munakata, M., Ishibashi, H., and Akaike, N. (1998). Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. Neuroscience *87*, 797–805.

Tiberi, M., and Caron, M.G. (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D1B receptor subtype. J. Biol. Chem. *269*, 27925–27931.

Tumova, K., Zhang, D., and Tiberi, M. (2004). Role of the fourth intracellular loop of D1-like dopaminergic receptors in conferring subtype-specific signaling properties. FEBS Lett. *576*, 461–467.

Urizar, E., Yano, H., Kolster, R., Galés, C., Lambert, N., and Javitch, J.A. (2011). CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. Nat. Chem. Biol. *7*, 624–630.

Wang, H.Y., Undie, A.S., and Friedman, E. (1995). Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. Mol. Pharmacol. *48*, 988–994.

Wersinger, C., Chen, J., and Sidhu, A. (2004). Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. Mol. Cell. Neurosci. *25*, 124–137.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol. Rev. *85*, 1159–1204.

Yano, H., Sánchez-Soto, M., and Ferré, S. (2017). Bioluminescence Resonance Energy Transfer Assay to Characterize Gi-Like G Protein Subtype-Dependent Functional Selectivity. Curr. Protoc. Neurosci. *81*, 5.33.1-5.33.13.

Yao, W.-D., Spealman, R.D., and Zhang, J. (2008). Dopaminergic signaling in dendritic spines. Biochem. Pharmacol. *75*, 2055–2069.

Yao, X.J., Vélez Ruiz, G., Whorton, M.R., Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Deupi, X., Sunahara, R.K., and Kobilka, B. (2009). The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 9501–9506.

Table 1. Competition binding experiments of [^{3}H] SCH 23390 versus dopamine and/or H_3R ligands in D_1R and H_3R-stably double transfected SK-N-MC cells. Dopamine parameters:

Ligand type	H_3R ligand	[ ]	K_{DB1} (nM)	K_{DB2} (nM)	K_{DB1} control / K_{DB1} modulator	K_{DB2} control / K_{DB2} modulator
	Control		5.0 ± 0.8	440 ± 20	1	1
Agonists	Histamine	300 nM	2.6 ± 0.9	680 ± 280	1.9	0.7
	Imetit	30 nM	1.9 ± 0.2	7.6 ± 0.8**	2.6	58
	Immepip	30 nM	1.7 ± 0.6	150 ± 50	2.9	3
	Immethridine	10 nM	9 ± 2	400 ± 100	0.6	1.1
	RAMH	30 nM	6 ± 1	24 ± 4**	0.8	18
	SAMH	1 µM	1.3 ± 0.3	115 ± 25	3.8	3.8
	Proxyfan	30 nM	5 ± 1	460 ± 140	1	1
Inverse agonist	BF 2649	10 nM	3.5 ± 0.6	210 ± 40	1.4	2.1
Antagonists	A 331440	300 nM	2.5 ± 0.6	10 ± 2**	2	44
	Carcinine	1 µM	4.1 ± 0.8	16 ± 3**	1.2	27
	Clobenpropit	30 nM	1.0 ± 0.3	55 ± 15*	5	8
	Conessine	300 nM	6.3 ± 1.5	25 ± 6**	0.8	17
	GT 2016	300 nM	2.0 ± 0.6	110 ± 30	2.5	4
	Impentamine	30 nM	2.3 ± 0.3	320 ± 60	2.2	1.4
	JNJ 10181457	30 nM	3.0 ± 0.5	260 ± 60	1.7	1.7
	JNJ 5207852	30 nM	2.3 ± 0.4	220 ± 50	2.2	2
	ROS 234	30 nM	3.2 ± 0.6	220 ± 60	1.6	2
	Thioperamide	300 nM	19 ± 4***	76 ± 16*	0.3	5.8
	VUF 4904	300 nM	0.8 ± 0.2	3.2 ± 0.8**	6.3	137
	VUF 5681	300 nM	1.0 ± 0.2	60 ± 10*	5	7.3

Binding parameters from competitive inhibition experiments of [^{3}H]SCH 23390 versus dopamine, and/or H_3 receptor ligands in membrane preparations from SK-N-MC cells stably expressing D_1R and H_3R (Supplementary Figure 3). K_{DB1} and K_{DB2} values were obtained according to the two-state dimer model (see *Materials and Methods*). K_{DB1} and K_{DB2} values (in nM) are expressed as means ± SEM of three experiments performed in triplicate. Statistical differences between affinity parameters of control versus H_3R-ligand treated were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001)

[^{3}H]SCH 23390 has a K_{DA1}= 0.14 ± 0.02 nM and exhibits no cooperativity (D_{CA}=0), since K_{DA2} = 0.56 ± 0.08 nM

Table 2. Functional characterization of D_1-like receptor selective agonists in D_1R-D_1R and D_1R-H_3R complexes by CODA-RET assays

D_1R-like agonist	$G\alpha_S$				$G\alpha_{i1}$	
	D_1R-D_1R		D_1R-H_3R		D_1R-H_3R	
	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)
DOPAMINE	101 ± 7	100 ± 7	184 ± 44	100 ± 6	4775 ± 2374	100 ± 10
SKF 38393	12 ± 3***	76 ± 13	2.8 ± 0.2** #	43 ± 1***	525 ± 203	85 ± 12
SKF 81297	3 ± 1***	93 ± 10	12.1 ± 1*** ###	103 ± 11	3241 ± 1387	129 ± 10
SKF 83959	27 ± 3***	75 ± 17	2.7 ± 0.7** ##	36 ± 9***	882 ± 249	105 ± 21
SKF 77434	25 ± 12***	57 ± 5	41 ± 25*	36 ± 3*** #	2815 ± 1319	133 ± 14

E_{MAX} = efficacy of D_1-like receptor agonists as the percentage of dopamine values (%)
EC_{50} = potency of each D_1-like receptor agonist (nM)
Values were obtained from a sigmoidal concentration-response function adjusted by non-linear regression analysis and are expressed as means ± SEM of 3 to 4 experiments performed in triplicate.
Statistical differences between dopamine and other D_1-like receptor agonists were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).
Statistical differences between heteromeric (D_1R-H_3R) and homomeric (D_1R-D_1R) systems were calculated by non-paired, two-tailed Student's t test ($^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$).

Table 3. Functional characterization of H_3R selective agonists in H_3R-H_3R and D_1R-H_3R complexes by CODA-RET assays

H_3R agonist	$G\alpha_{i1}$				$G\alpha_s$	
	H_3R-H_3R		D_1R-H_3R		D_1R-H_3R	
	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)
HISTAMINE	141 ± 16	100 ± 4	75 ± 10$^{\#\#}$	100 ± 3	ND	ND
RAMH	34 ± 9***	119 ± 8	9 ± 1*** $^{\#\#}$	108 ± 11	ND	ND
IMETIT	16 ± 2***	85 ± 10	6 ± 1*** $^{\#\#}$	89 ± 3	ND	ND
IMMEPIP	5 ± 1***	60 ± 3**	1.6 ± 0.4*** $^{\#\#}$	58 ± 1***	ND	ND

E_{MAX} = efficacy of H_3R agonists as the percentage of histamine values (%)
EC_{50} = potency of each H_3R agonist (nM)
ND= not detectable
Values were obtained from a sigmoidal concentration-response function adjusted by non-linear regression analysis and are expressed as means ± SEM of 3 to 4 experiments performed in triplicate.
Statistical differences between histamine and each H_3R agonist were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$).
Statistical differences between the heteromeric (D_1R-H_3R) and the homomeric (H_3R-H_3R) system were calculated by non-paired, two-tailed Student's t test ($^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$).

Table 4. Functional characterization of H_3R selective agonists in H_3R-H_3R and D_1R-H_3R complexes by G-protein activation BRET assays

Gα subunit	Receptors	HISTAMINE		RAMH		IMETIT		IMEPIP	
		EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)
$G\alpha_{o1}$	H_3R-H_3R	10 ± 1	100 ± 3	2.1 ± 0.5	102 ± 5	0.93 ± 0.09	92 ± 5	0.57 ± 0.19	89 ± 8
	D_1R-H_3R	12 ± 1	100 ± 2	2.8 ± 0.3**	106 ± 5	1.35 ± 0.31	111 ± 3	0.74 ± 0.09	99 ± 4
$G\alpha_{o2}$	H_3R-H_3R	17 ± 2	100 ± 2	2.3 ± 0.5	99 ± 2	0.88 ± 0.16	89 ± 3	0.32 ± 0.08	91 ± 5
	D_1R-H_3R	16 ± 2	100 ± 2	2.7 ± 0.4*	100 ± 2	0.56 ± 0.08	90 ± 2	0.38 ± 0.10	90 ± 6
$G\alpha_{i1}$	H_3R-H_3R	17 ± 3	100 ± 4	1.8 ± 0.3	105 ± 7	0.81 ± 0.06	94 ± 3	0.25 ± 0.06	97 ± 3
	D_1R-H_3R	12 ± 2	100 ± 2	1.2 ± 0.1$^{\#}$	100 ± 4	0.71 ± 0.13	94 ± 2	0.40 ± 0.26	97 ± 9
$G\alpha_{i2}$	H_3R-H_3R	25 ± 5**	100 ± 1	3.1 ± 0.4	112 ± 1	0.44 ± 0.07	100 ± 2	0.72 ± 0.01	102 ± 4
	D_1R-H_3R	27 ± 4*	100 ± 1	4.3 ± 0.8***	96 ± 6	2.81 ± 1.38**	75 ± 5$^{\#\#}$	1.74 ± 0.60**	79 ± 1$^{\#\#}$
$G\alpha_{i3}$	H_3R-H_3R	21 ± 5	100 ± 2	3.1 ± 0.9	118 ± 15	0.39 ± 0.05	92 ± 6	0.97 ± 0.21*	85 ± 9
	D_1R-H_3R	33 ± 7***	100 ± 1	4.5 ± 1.2***	106 ± 3	0.82 ± 0.25	96 ± 1	1.02 ± 0.34	95 ± 3

Potency (EC_{50} values, in nM) and relative efficacy (E_{MAX} values, as the percentage of histamine values) of histamine and the H_3R selective agonists RAMH, imetit and imepip obtained from G-protein activation BRET experiments mediated by H_3R coupled to different Gαi/o subtypes

E_{MAX} and EC_{50} values were obtained from a sigmoidal concentration-response function adjusted by non-linear regression analysis and are expressed as means ± SEM of 3 to 5 experiments performed in triplicate.

For each parameter (E_{MAX} or EC_{50}):

- statistical differences between Gαi/o protein subtypes for each H_3R agonist and each receptor complex were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test versus parameters obtained from the Gαi/o subtype exhibiting the highest potency (lowest EC_{50} value) (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001)
- statistical differences between homomer and heteromer parameters for each Gαi/o protein subtype and each H_3R agonist were calculated by non-paired, two-tailed Student's t test ($^{\#}p$ < 0.05)

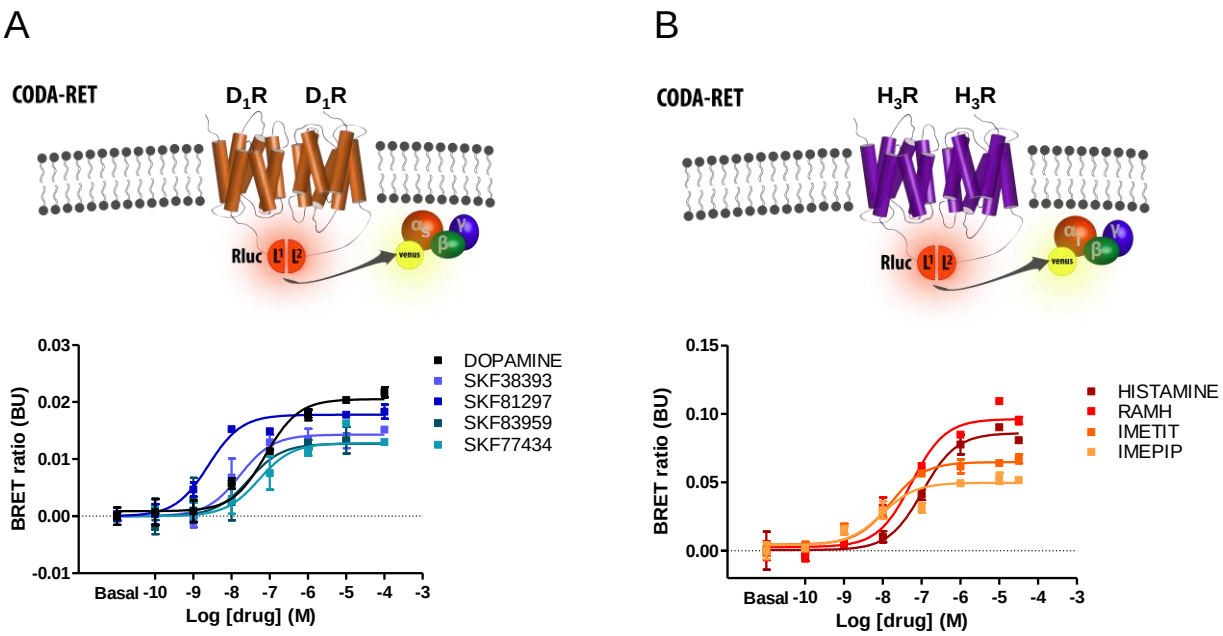


Figure 1. G-protein activation pharmacological profiles of D_1R-like and H_3R selective agonists in D_1R-D_1R and H_3R-H_3R homodimers obtained by CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and D_1R-cRLuc **(A)** or H_3R-nRLuc and H_3R-cRLuc **(B)** together with Gαs-mVenus **(A)** or Gαi1-mVenus **(B)** and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of D_1-like receptor selective agonists **(A)** or with H_3R agonists **(B)**. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the agonist concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.) and summary data are presented in Table 2 **(A)** and Table 3 **(B)**. The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of homodimers and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.

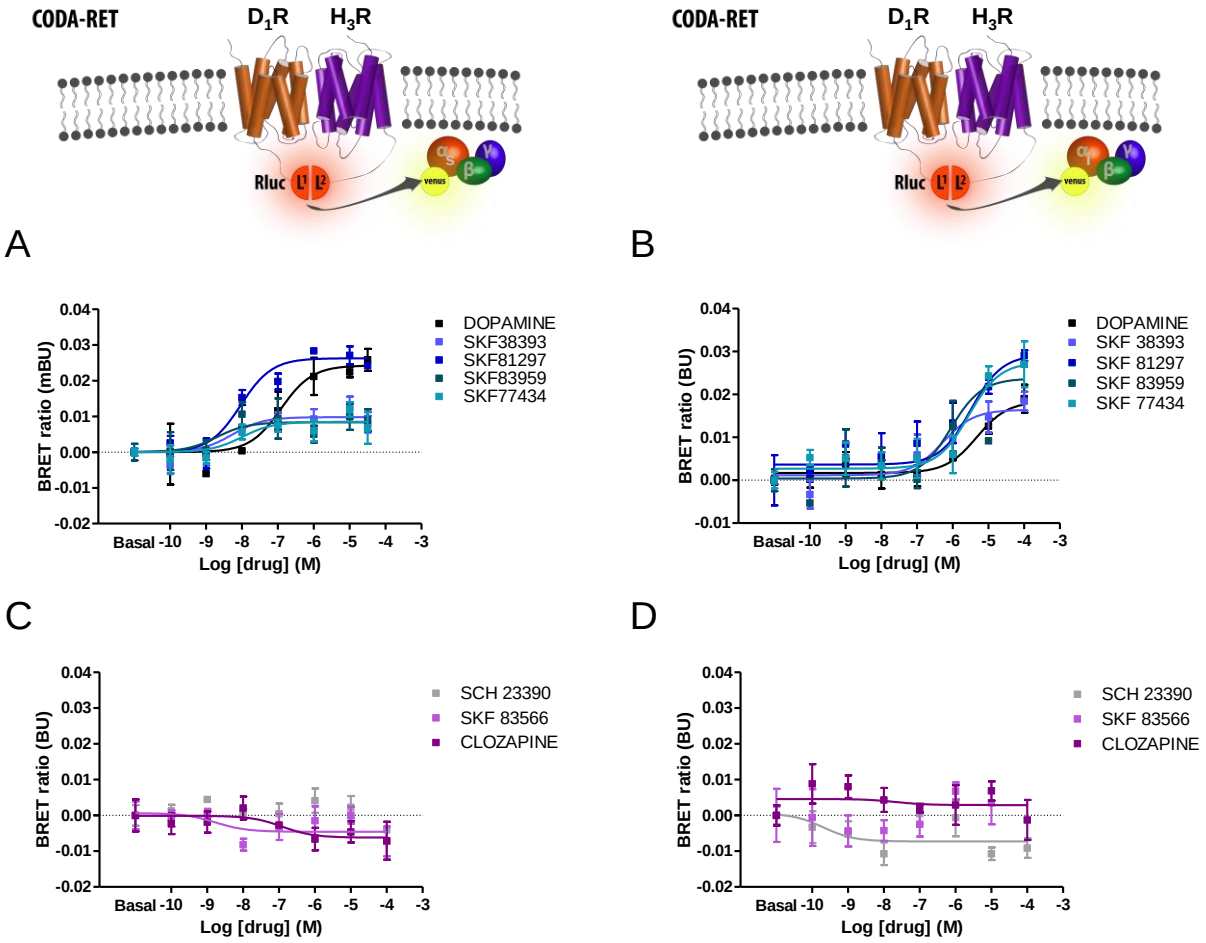


Figure 2. G-protein activation pharmacological profiles of D_1R-like agonists in D_1R-H_3R heteromers obtained by CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and H_3R-cRLuc together with Gαs-mVenus **(A)** or Gαi1-mVenus **(B)** and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of D_1-like receptor selective agonists **(A, B)** or antagonists **(C, D)**. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the agonist concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.) and summary data are presented in Table 2. The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of the heteromer and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.

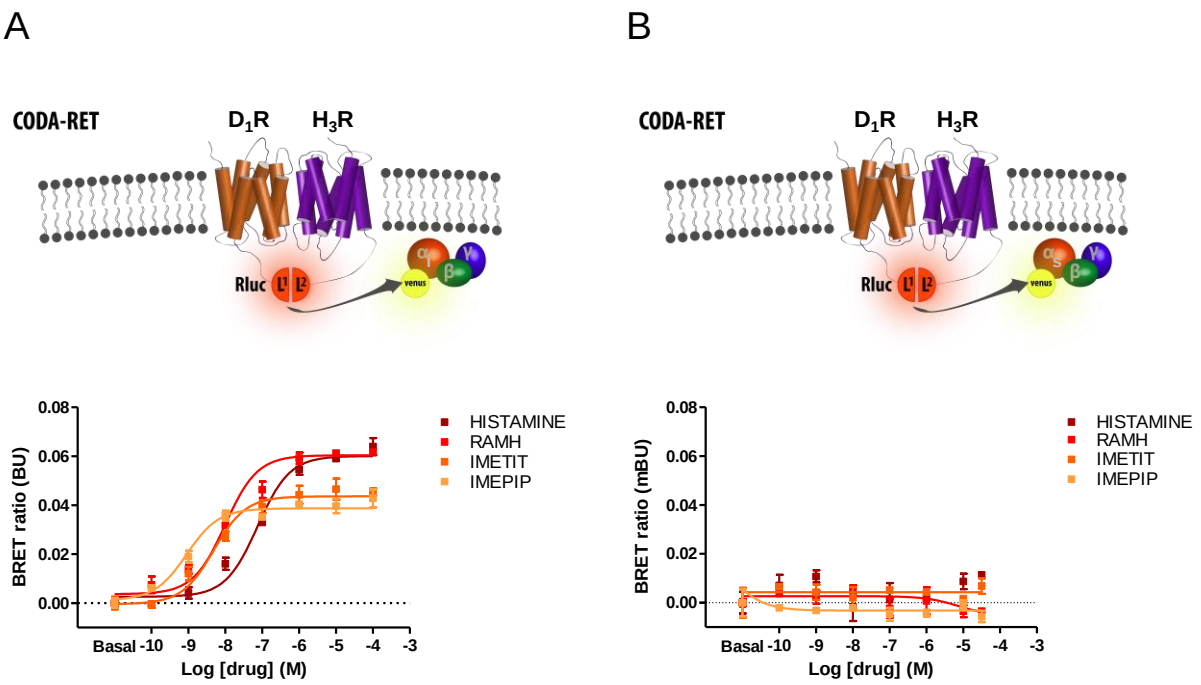


Figure 3. G-protein activation pharmacological profiles of H_3R-selective agonists in D_1R-H_3R heteromers obtained by CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and H_3R-cRLuc together with Gαi1-mVenus **(A)** or Gαs-mVenus **(B)** and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of H_3R-selective agonists. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.). The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of the heteromer and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.

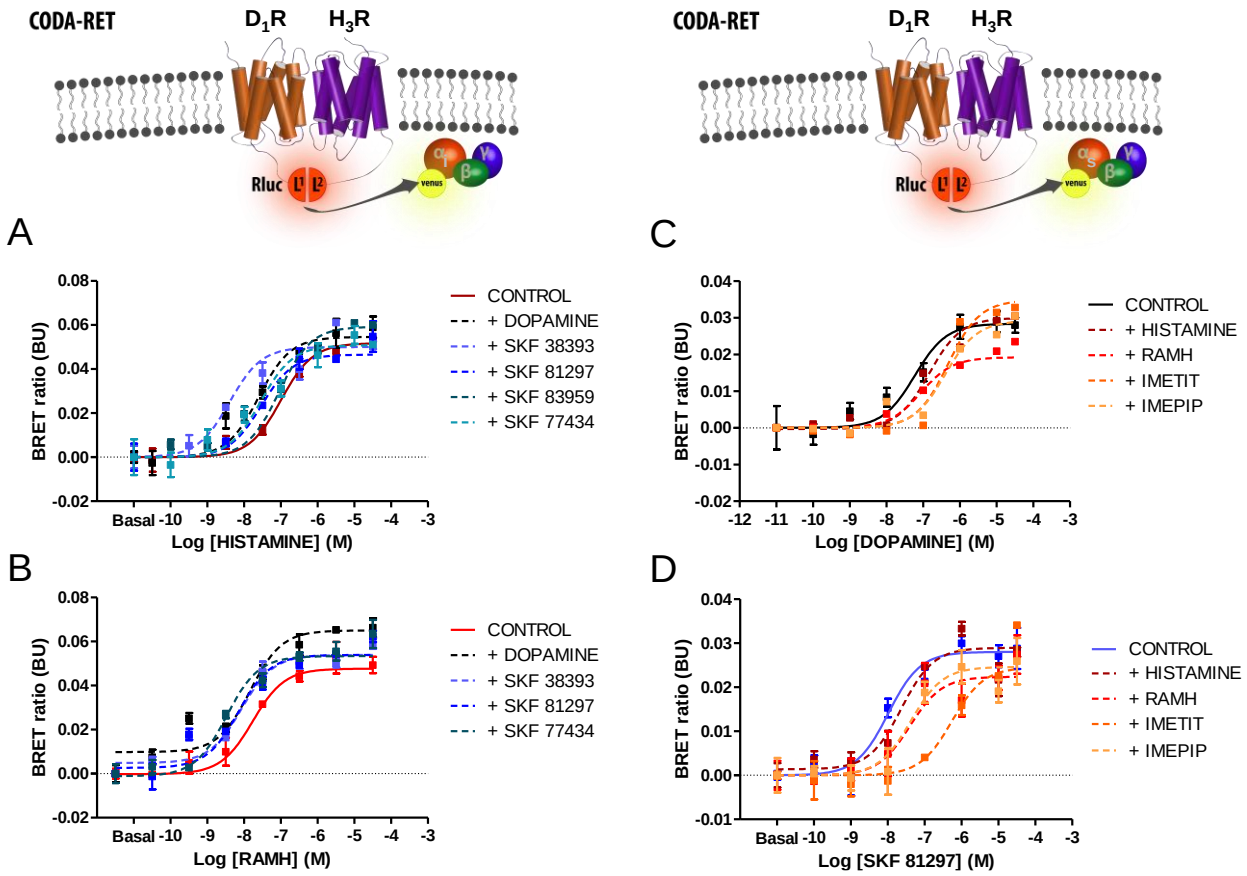


Figure 4. Functional allosteric modulations at G-protein activation in D_1R-H_3R heteromers by CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and H_3R-cRLuc together with Gαi1-mVenus **(A, B)** or Gαs-mVenus **(C, D)** and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of histamine **(A),** the H_3R-selective agonist RAMH **(B)**, dopamine **(C)** or the D_1R-like selective agonist SKF81297 **(D)** in the absence (control) or in the presence (dashed lines) of agonists of the partner receptor in the D_1R-H_3R heteromer. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.). The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of the heteromer and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.

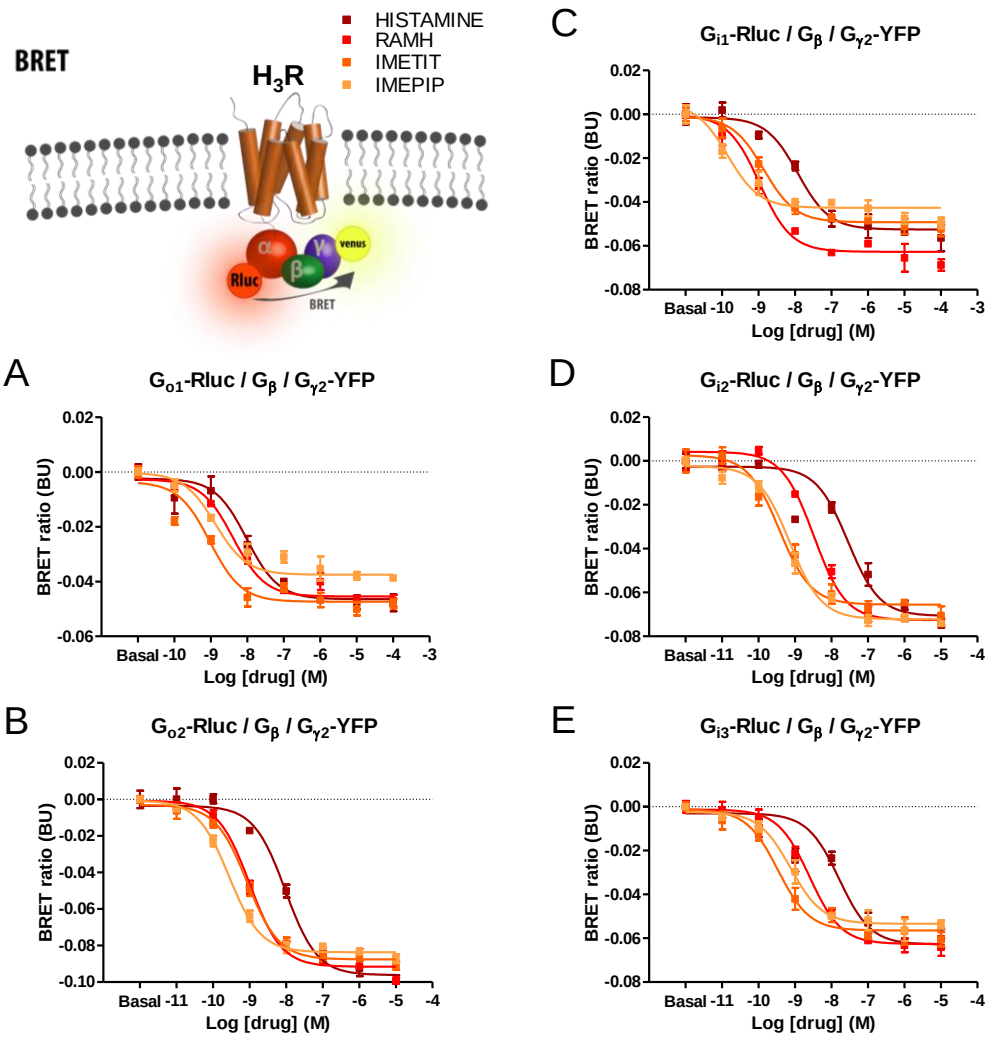


Figure 5. Gα$_{i/o}$-protein subtype pharmacological profiles of H_3R selective agonists determined by G-protein activation BRET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with H_3R together with each Gαi/o subtype (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 or Gαi3) fused to Rluc (**A,B,C,D,E,** respectively), an unfused Gβ1 subunit and a Gγ2-mVenus subunit. G-protein activation BRET assays were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of an H_3R-selective agonist. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.). The diagram indicates the constructs expressed: H_3R (brown), Gαi/o subunit fused to Rluc (red), Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) fused to mVenus (yellow) subunits; the arrow represents the energy transfer.

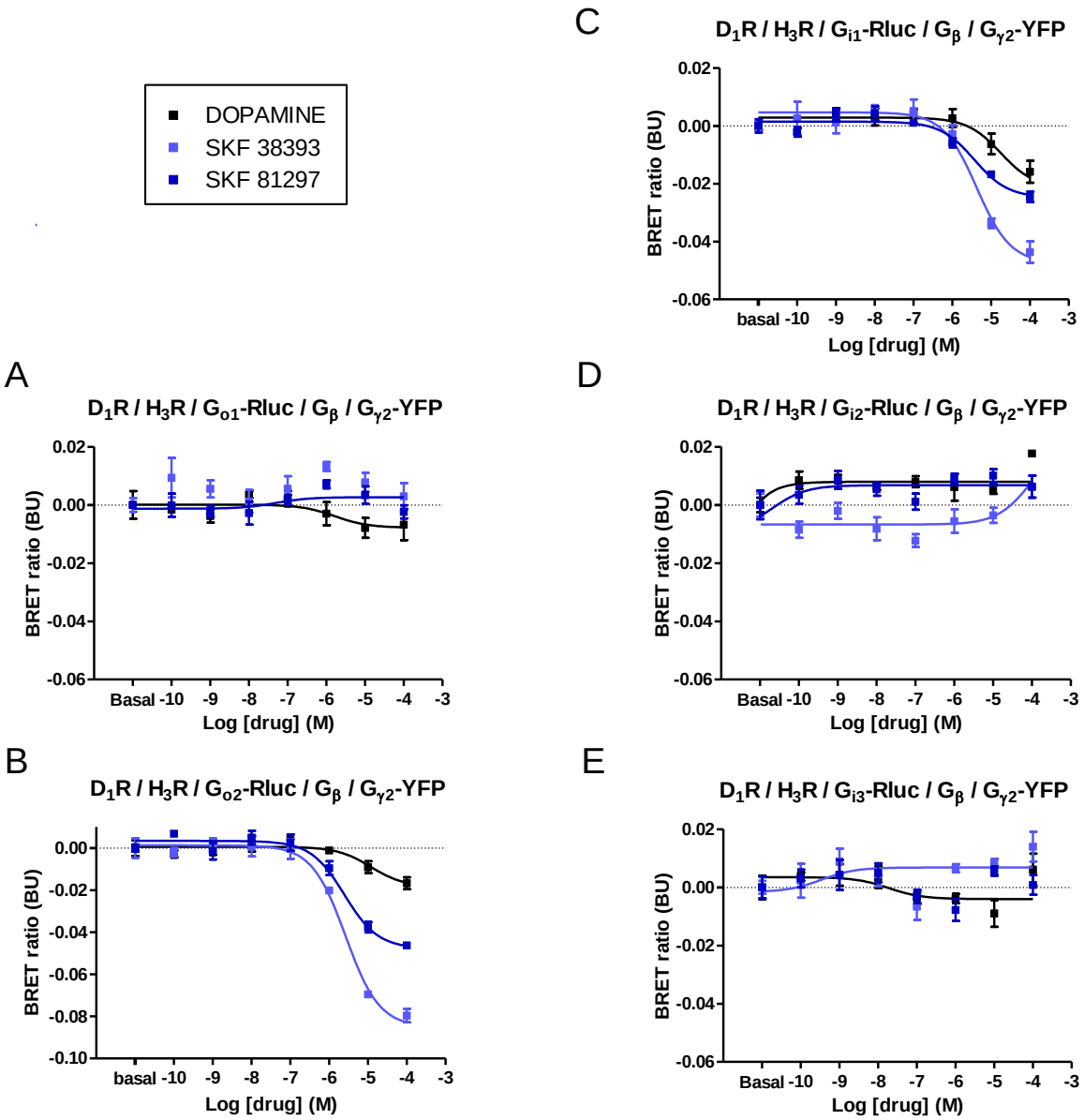
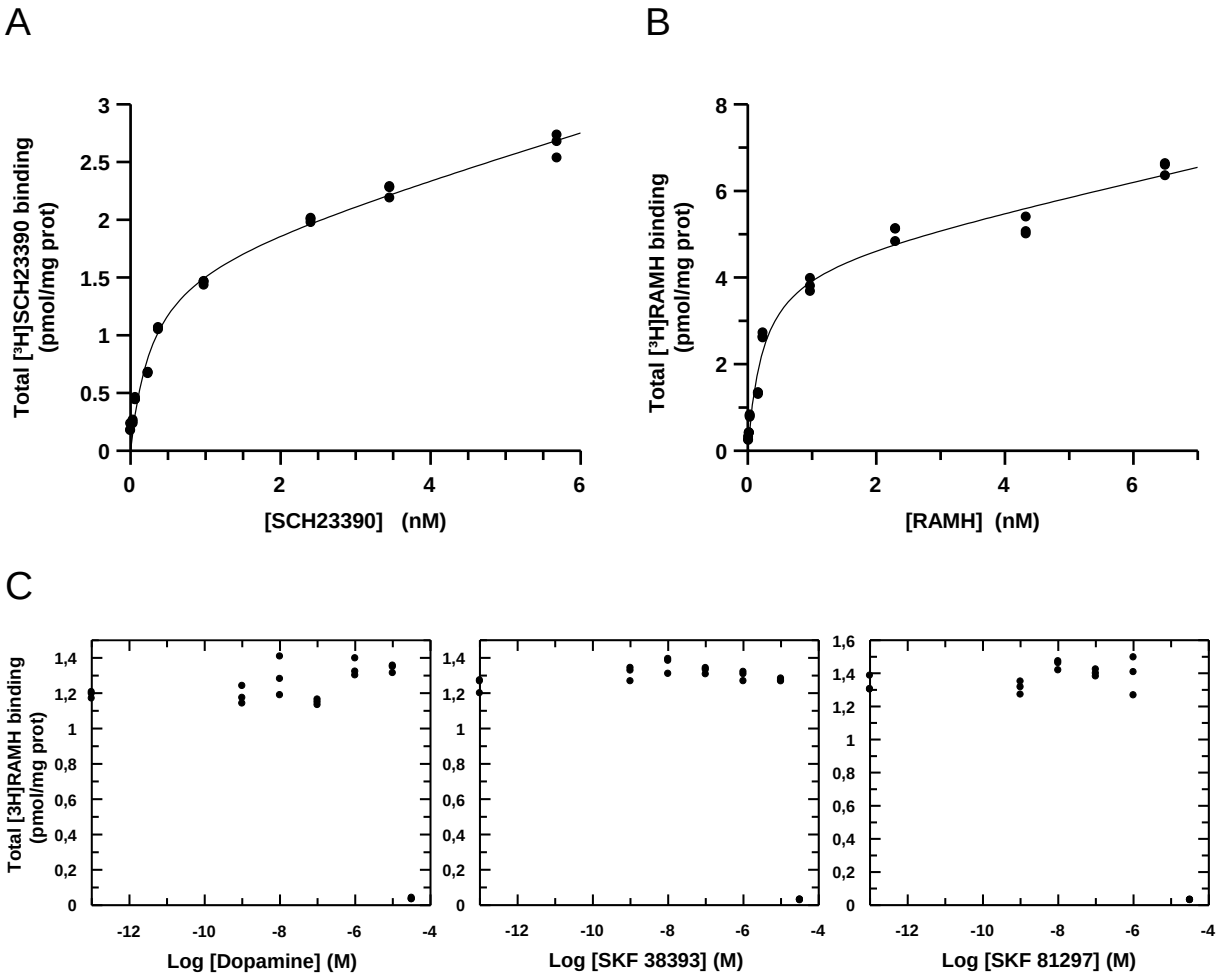
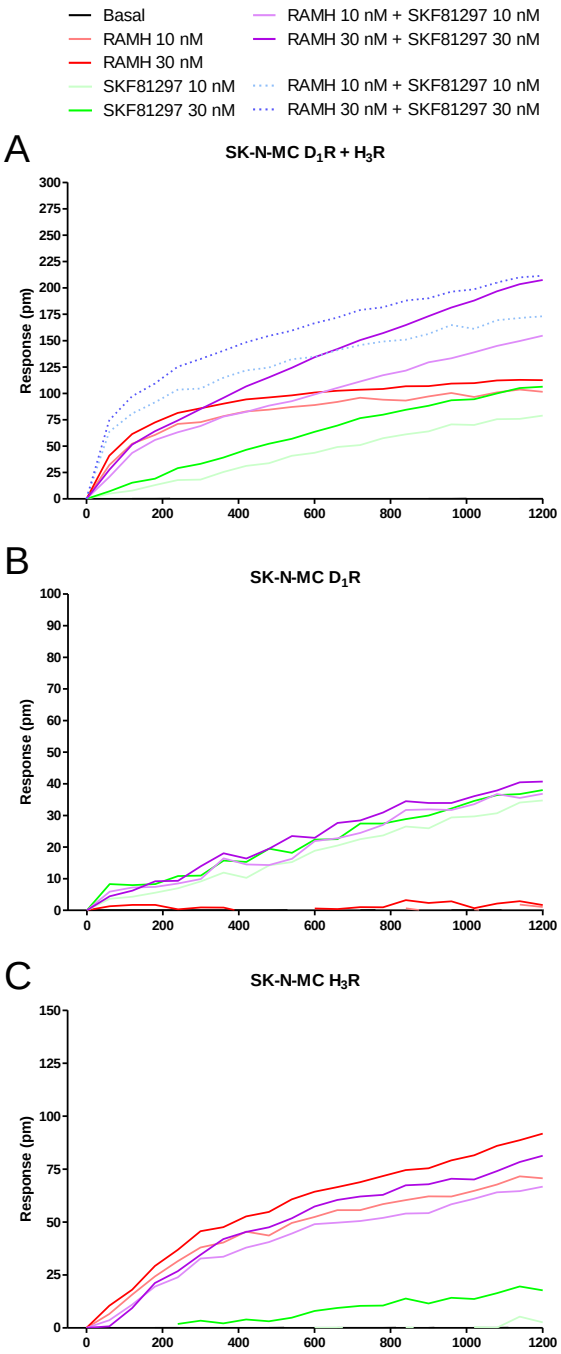


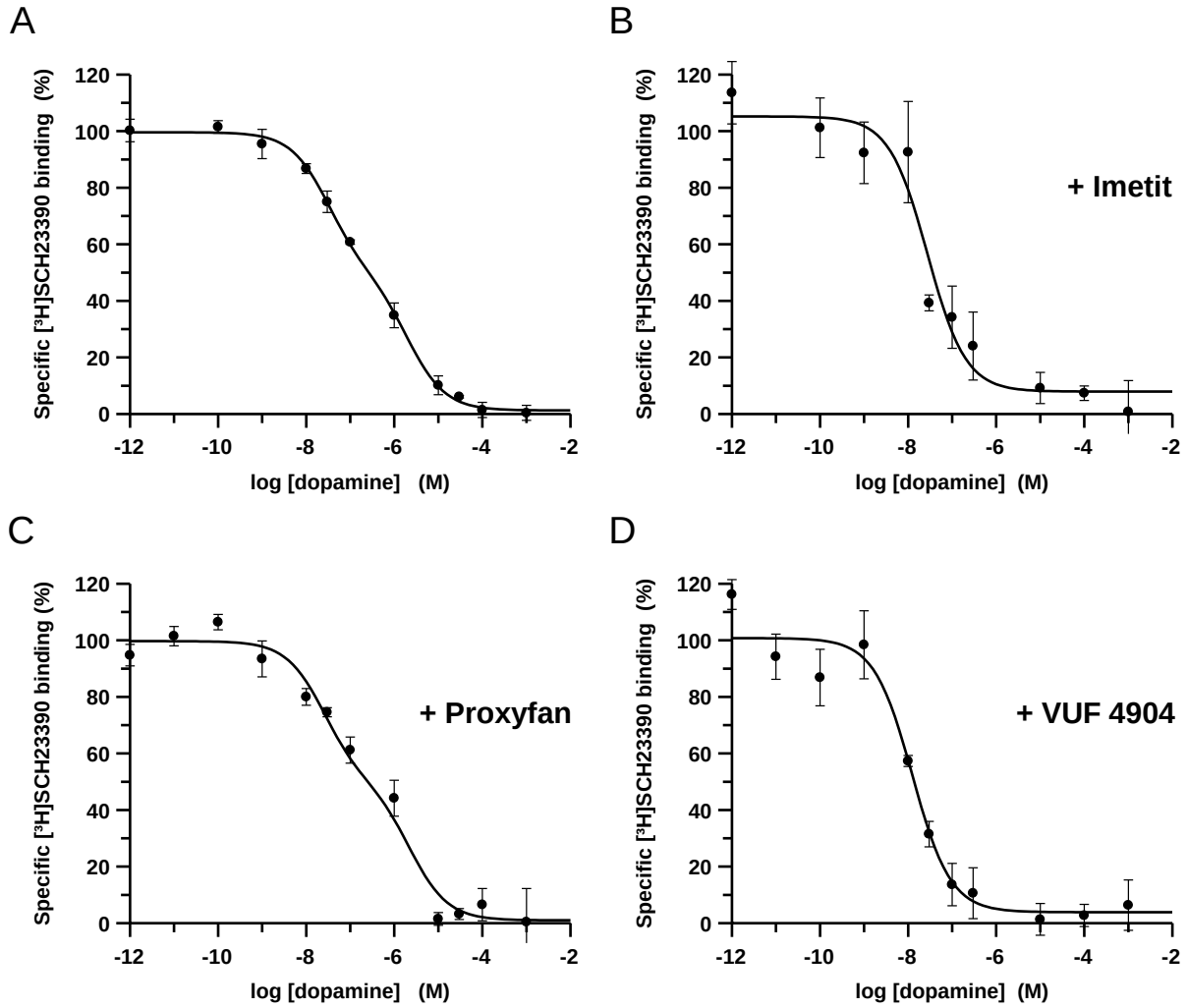
Figure 6. Gα$_{i/o}$-protein subtype pharmacological profiles of D_1R-like selective agonists determined by G-protein activation BRET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R and H_3R together with each Gαi/o subtype (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 or Gαi3) fused to Rluc (**A,B,C,D,E,** respectively), an unfused Gβ1 subunit and a Gγ2-mVenus subunit. G-protein activation BRET assays were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of a D_1R-like selective agonist. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least four independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.).



Supplementary Figure 1. D_1R and H_3R are stably expressed in SK-N-MC cells with appropriate levels and affinity constants. Radioligand saturation curves with increasing concentrations of D_1-like receptor antagonist [^{3}H] SCH 23390 **(A)** or H_3 receptor agonist [^{3}H] RAMH **(B)** were performed in D_1R and H_3R-stably double transfected SK-N-MC cells. In **(C)** competition curves with a fixed amount of [^{3}H] RAMH (=2nM) and increasing concentrations of D_1-like receptor agonists were performed in H_3R stably transfected SK-N-MC cells, where the last point show total displacement by non-radiolabeled RAMH. Experimental data were fitted to the two-state dimer receptor model equations, as described in the *Materials and Methods* section. The obtained RT and K_{D1} values referred in text accounts for the total number of dimers (RT) and the affinity constants for each homodimer. Values are mean ± SEM from a representative experiment (n = 3) performed in triplicate.

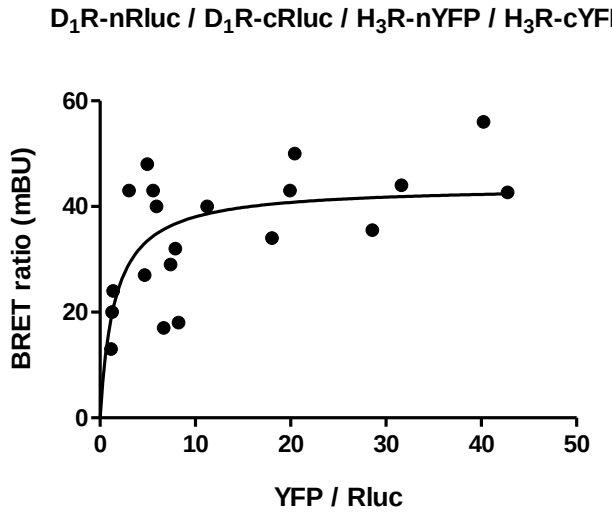


Supplementary Figure 2. D_1R and H_3R are functionally expressed in SK-N-MC cells. DMR induced by the H_3 agonist RAMH, the D_1-like receptor agonist SKF81297 or both in a label-free assay performed in D_1R and H_3R-stably double transfected **(A)**, D_1R-stably transfected **(B)** and H_3R-stably transfected **(C)** SK-N-MC cells. The resulting shifts of reflected light wavelength (pm) were monitored over time. Solid lines are the mean of a representative optical trace experiment carried out in triplicates and dotted lines show the theoretical co-activation expressed as the sum of the indicated ligand individual activations. Each panel is a representative experimentof n = 3 different experiments

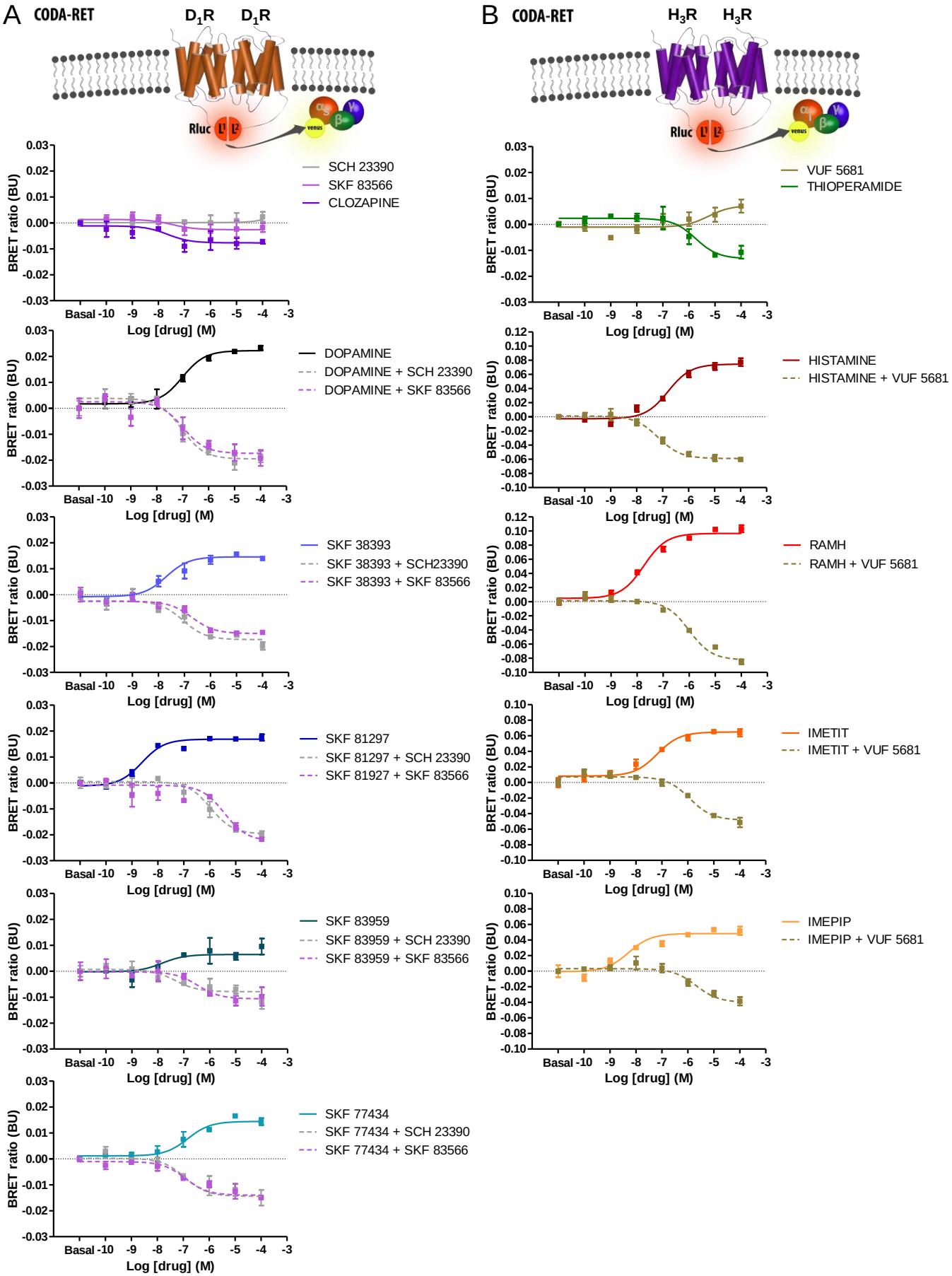


Supplementary Figure 3. Dopamine binding to D_1R is positively modulated by H_3R ligands through D_1R-H_3R heteromers in stably transfected SK-N-MC cells. Representative radioligand competition curves of D_1-like receptor antagonist [^{3}H] SCH 23390 vs. increasing concentrations of dopamine in the absence **(A)** or presence of a fixed concentration of H_3 receptor agonists **(B)** and antagonists **(C, D)**. Values are expressed as a percentage of the specific binding and experimental data were fitted to the two-state dimer receptor model equations, as described in the *Materials and Methods* section. Values are mean ± SEM from a representative experiment (n = 3) performed in triplicate.

.

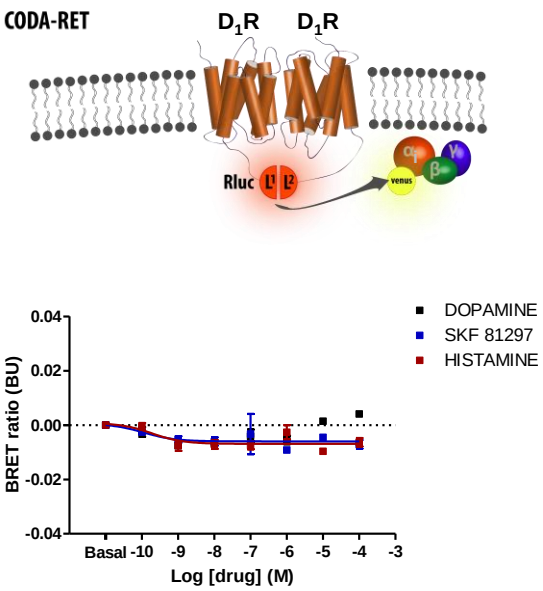


Supplementary Figure 4. Dopamine D_1 and histamine H_3 receptors form heterotetrameric complexes in HEK-293T cells. BRET with bimolecular luminescent and fluorescent complementation experiments were performed with HEK-293T cells co-expressing D_1 receptor–nRLuc, D_1 receptor–cRLuc, H_3 receptor–nYFP and H_3 receptor–cYFP constructs. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid–n/cYFP (0.5–9 µg of each cDNA) whereas the complemented Rluc levels have maintained constant (2-3 µg of each cDNA). Both fluorescence and luminiscence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 50.000 luminescent units) while monitoring the increase of acceptor expression (5000–20.000 fluorescent units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (complemented YFP) and the luciferase activity of the donor (complemented Rluc). BRET data are expressed as means of 5 different experiments performed in duplicate.

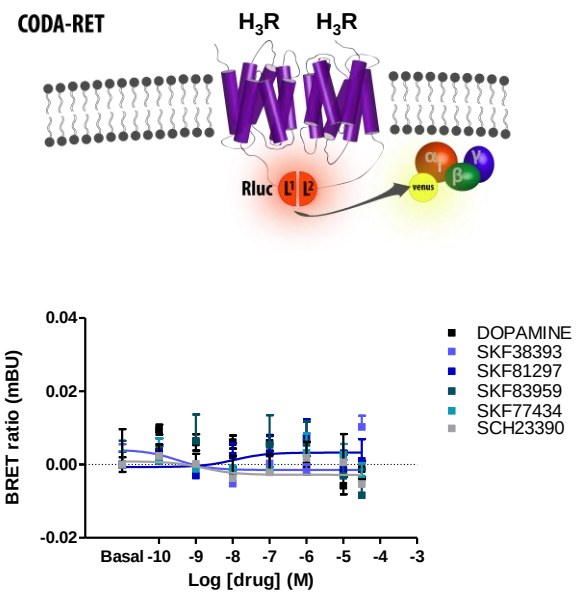


Supplementary Figure 5. D_1 and H_3 receptor specificity of G-protein activation in CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and D_1R-cRLuc together with Gαs-mVenus **(A)** or H_3R-nRLuc and H_3R-cRLuc with Gαi1-mVenus **(B)** and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of D_1-like receptor selective **(A)** or H_3R selective **(B)** agonists (increasing curves) or a fixed concentration (1μM) of each agonist with increasing concentrations of the respective selective antagonists (decreasing curves). For each agonist, results from one experiment performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.) were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of the homodimers and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.

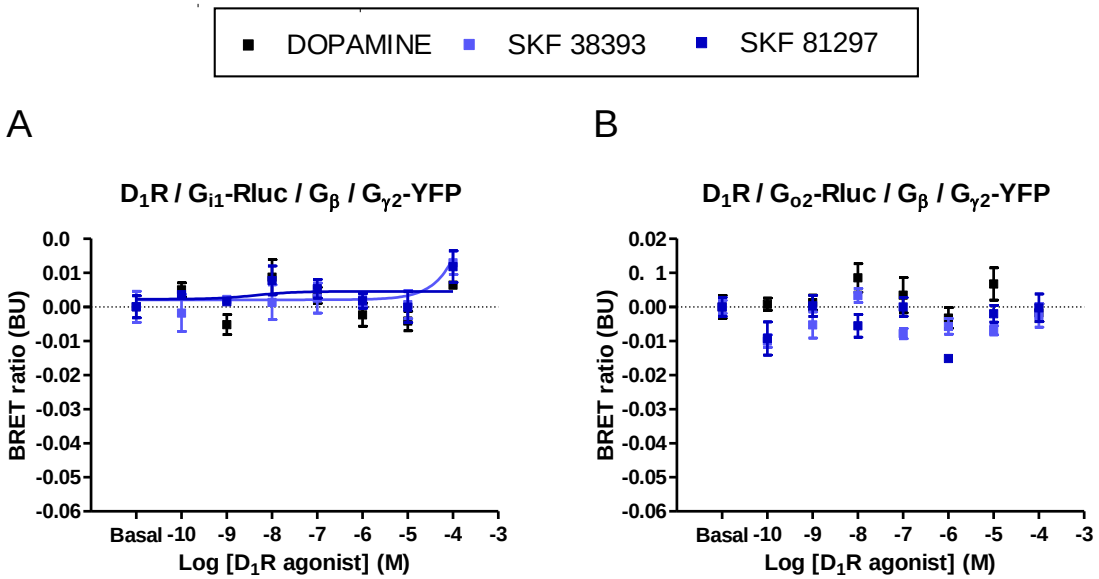
A



B



Supplementary Figure 6. No evidence of functional cross-reactivity by D_1 or H_3 receptor agonists in CODA-RET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R-nRLuc and D_1R-cRLuc **(A)** or H_3R-nRLuc and H_3R-cRLuc **(B)** together with Gαi1-mVenus and unfused Gβ1 and Gγ2 subunits. CODA-RET experiments were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of the indicated ligand. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.). The diagrams indicate the constructs expressed: D_1R (brown) and H_3R (purple) with the complemented Rluc (red) at the C-terminus of each protomer of the homodimers and the indicated Gα sensor fused to mVenus (yellow), the Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) subunits; the arrow represents the energy transfer.



Supplementary Figure 7. D_1R-like selective agonists cannot activate $G\alpha_{i1}$ nor $G\alpha_{o2}$-protein subtypes by **G-protein activation BRET assays when H_3R is not co-transfected.** HEK-293T cells were transiently transfected with D_1R together with Gαi1 **(A)** or Gαo2 **(B)** subunits fused to Rluc, an unfused Gβ1 subunit and a Gγ2-mVenus subunit. G-protein activation BRET assays were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of a D_1R-like selective agonist. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of at least three independent experiments performed with triplicate samples (error bars=S.E.M.).

3.5 Selectividad funcional de isoformas del receptor H_3 de histamina humano: modulación por heteromerización con receptores D_1 de dopamina

Mar Rodríguez-Ruiz, Josefa Mallol, Antoni Cortés, Sergi Ferré, Enric I. Canela, Estefanía Moreno*, Vicent Casadó*

*Contribuyeron igualmente

Manuscrito preparado para su revisión en *ACS Chemical Biology, 2018*

Se ha descrito la existencia de al menos 20 isoformas distintas del receptor de histamina H_3 (H_3R) con distinta distribución cerebral y farmacología, aunque muchas aún no han sido totalmente caracterizadas. En este trabajo se ha descrito el perfil de activación de distintos subtipos de proteína Gαi/o (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 y Gαi3) y de reclutamiento de β-arrestina I de cuatro isoformas de H_3R (H_3R329, H_3R365, H_3R415 y H_3R445) que difieren principalmente en la longitud de su tercer bucle intracelular, mediante ensayos de transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET) funcionales. Al comparar su eficacia en la activación de proteínas Gi/o y en el reclutamiento de proteína β-arrestina I se ha observado que presentan distinto grado de funcionalidad en proporción inversa al nivel de deleción de su secuencia, llegando en el caso de algunas isoformas a no producirse activación, un fenómeno que previamente ha sido propuesto como una selectividad funcional dependiente de isoforma. Como ya había sido demostrado previamente para la isoforma H_3R445, mediante ensayos de BRET se ha demostrado que las isoformas H_3R329, H_3R365, H_3R413 y H_3R415 también son capaces de formar heterómeros tanto con el receptor de dopamina D_1 (D_1R) como con el receptor glutamatérgico NMDA, así como complejos heterotriméricos con ambos receptores. De forma notable, la heteromerización de estas isoformas con el D_1R provoca una clara modulación de la existente selectividad funcional dependiente de isoforma, tanto a nivel de activación de proteínas Gαi/o como del reclutamiento de β-arrestina I. Estos resultados aportan evidencias de la importancia funcional de la heteromerización entre el D_1R y diversas isoformas de H_3R y elevan el nivel de complejidad inherente a la neurotransmisión histaminérgica.

HUMAN HISTAMINE H_3 RECEPTOR ISOFORM BIAS: MODULATION BY HETEROMERIZATION WITH DOPAMINE D_1 RECEPTORS

Mar Rodríguez-Ruiz[1,2,3], Josefa Mallol[1,2,3], Antoni Cortés[1,2,3], Sergi Ferré[4], Enric I. Canela[1,2,3], Estefanía Moreno[1,2,3]*, Vicent Casadó[1,2,3]*

Affiliations:

1 Molecular Neurobiology laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

2 Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

3 Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

4 Integrative Neurobiology Section, National Institute on Drug Abuse, Intramural Research Program, National Institutes of Health (NIH), Triad Technology Building, 333 Cassell Drive, Baltimore, MD 21224, USA. Electronic address: sferre@intra.nida.nih.gov

*Equal contribution

Corresponding authors:

Estefanía Moreno
estefaniamoreno@ub.edu
+34 934021213

Vicent Casadó
vcasado@ub.edu
+34 934021213

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona,
Av. Diagonal 643. Prevosti Building. 08028 Barcelona. Spain.

SUMMARY

At least 20 distinct isoforms of the histamine H_3 receptor (H_3R) have been identified as a result of gene splicing events, with distinct brain expression patterns and signaling properties, although many still have not been fully characterized. In this work, we have described the activation profile of distinct Gαi/o protein subtypes (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 y Gαi3) and of β-arrestin I recruitment of four H_3R isoforms (H_3R329, H_3R365, H_3R415 y H_3R445) that mainly differ in the length of their third intracellular loop, by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) functional assays. Comparing efficacies among H_3R isoforms in both functional assays brings to light that they have different degrees of functionality in inverse proportion to the level of deletion of their sequence, in some cases even showing no activation, a phenomenon that has previously been suggested as isoform-functional selectivity or isoform bias. As it had been previously shown for the H_3R445 isoform, BRET assays reveal that H_3R329, H_3R365, H_3R413 y H_3R415 can also form heteromers with the dopamine D_1 receptor (D_1R), with the glutamate NMDA receptor and with both receptor simultaneously forming heterotrimeric complexes. Importantly, H_3R-isoforms heteromerization with D_1R causes a clear modulation of the isoform bias, both at the level of G-protein dependent signaling (Gαi/o activation and cAMP-levels reduction) and at the level of β-arrestin I recruitment. These findings provide evidence of the importance of heteromerization between distinct H_3R isoforms and D_1R and enlarge the complexity level inherent to the histaminergic neurotransmission.

KEYWORDS

GPCR, G-protein-coupled receptor, heteromers, dopamine receptor, histamine H_3 receptor isoform, glutamate receptor, functional selectivity

INTRODUCTION

Histamine is considered as a major modulator of multiple biological processes including locomotor activity, emotions, cognitive processes, circadian rhythms, pain perception, energetic and immune homeostasis, digestion and breathing (Haas and Panula, 2003; Haas et al., 2008; Schwartz et al., 1991). This biogenic amine is synthesized in a specific group of neurons located in the hypothalamus tuberomammillary nucleus (TMN), which send diffuse projections to the whole central nervous system (CNS), reflecting its potential to regulate multiple neuronal pathways (Haas et al., 2008; Watanabe et al., 1984). The physiological functions of this neurotransmitter are mediated by its action on four distinct G-protein coupled receptors (GPCR): H_1R, H_2R, H_3R and H_4R. In contrast to the rest of histaminergic receptors, the H_3R has constitutive activity (Arrang et al., 2007; Morisset et al., 2000) and is located presynaptically, what allows this receptor to negatively regulate not only the release of histamine (autoreceptor) but also the release of other neurotransmitters (heteroreceptor), including serotonin, noradrenalin, dopamine, glutamate, GABA and, probably, acetylcholine, although the last seems to be regulated by a transsynaptic mechanism rather than by presynaptic inhibition at cholinergic terminals (Blandina and Passani, 2016; Schlicker and Kathmann, 2017). Other important histaminergic functions mediated by H_3R consists in its involvement in the impulse flow along the histaminergic neurons (somadendritic autoreceptor), its regulation of histamine synthesis and its postsynaptic histaminergic signaling. Although H_3R is widely expressed in human brain, its high levels detected in areas related to cognition such as striatum, cerebral cortex and hippocampus (Pillot et al., 2002), along with its key role regulating multiple brain circuits, has led to consider this receptor as a promising target for the development of new drugs for the treatment of numerous neurological disorders, including epilepsy, attention deficit hyperactivity disorder, insomnia, narcolepsy, Parkinson's disease, schizophrenia or Alzheimer's disease. The wide range of action of histaminergic ligands may stand for the modulator nature of histamine over other neurotransmitters, which besides have the advantage of presenting less side effects than acting directly over excitatory or inhibitory neurotransmitter systems (Hu and Chen, 2017).

Although H_3R was first identified as a functional entity in 1983 (Arrang et al., 1983), was its cloning 16 years later (Lovenberg et al., 1999) that allowed for the confirmation of its coupling to Gαi/o proteins and for the identification of multiple H_3R isoforms originated by alternative splicing of pre-mRNA transcripts (Cogé et al., 2001). To date, 20 distinct H_3R isoforms have been identified, although only 8 seem to be able to bind agonists and be functional (Bakker, 2004; García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Leurs et al., 2005; Nieto-Alamilla et al., 2016; Wellendorph et al., 2002). From those H_3R isoforms proved to be functional, several have shown specific pharmacological properties in relation to its ligand binding and its ability to signal through effectors, which may importantly affect the cellular responses to histamine, as e.g. it is the case of the H_3R365 and H_3R413 isoforms, which have been proposed to be the human and rat autoreceptors *in vivo*, respectively (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Gbahou et al., 2012).

In the present work, we wanted to perform a detailed study of four distinct isoforms analysing its activation profiles through two main signaling pathways of GPCRs: G-protein dependent signaling (analysing 5 distinct Gαi/o subtypes) and β-arrestin I recruitment. In addition, since it was previously described that isoform H_3R445 of the H_3R , the most abundant in brain along with H_3R365 and H_3R415 isoforms (Cogé et al., 2001), is able to interact with other receptors as D_1R and NMDAR with important biological consequences (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011, 2014; Rodríguez-Ruiz et al., 2016), we wanted to check if this possibility also exists for other H_3R isoforms and if they imply functional

modulations. The knowledge of the physiological role of the existing spectrum of H_3R splice variants is of high importance, not only for the understanding of the histaminergic system but also for the possibility of developing new therapeutic drugs able to regulate other neurotransmitters acting through H_3R and hopefully reduce the broad brain effects displayed by current selective H_3R ligands.

MATERIALS AND METHODS

cDNA constructs

All human H_3R isoforms (329, 365, 413, 415 and 445) with and without YFP fusion protein in their C-terminal end were gently supplied by Rob Leurs laboratory from Vrije University, Amsterdam. D_1R-Rluc and D_1R-YFP constructs correspond with the human receptors fused to *Renilla luciferase* (Rluc) or to fluorescent protein YFP on the C-terminal end of the receptor, which were obtained and characterized as previously described (Ferrada et al., 2009; Navarro et al., 2010). NMDAR subunits NRA1 and NR2B were gently supplied by Dr. Julie Perroy. D_1R-nRluc and NR1A-cRluc were obtained by subcloning the named supplied subunits into pcDNA3.1 expressing the amino acid residues 1-229 (nRLuc) and 230-311 (cRLuc) of the RLuc8 protein, respectively. For G-protein activation BRETS, human Gαi/o subunits (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) fused to Rluc8, the $G\beta_1$ subunit and the $G\gamma_2$ subunit fused to mVenus were used.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney HEK-293T cells were maintained in culture with Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100), and 5% heat-inactivated fetal bovine serum and kept in an incubator at 37°C and 5% CO_2. Cells were transiently transfected with the corresponding cDNA by the ramified polyethylenimine (PEI; Sigma) method (Ferrada et al., 2009; Navarro et al., 2010).

BRET and BRET with bimolecular luminescence complementation assays

Cells were transiently co-transfected with polyethylenimine with a constant amount of expression vector encoding for the corresponding receptor fused to Rluc (BRET saturation curves) or the corresponding receptors fused to nRLuc and cRluc (BRET with bimolecular luminescence complementation assays) together with increasing amounts of the expression vector corresponding to receptors fused to YFP (see Figure captions). Cells were harvested, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline. For determining YFP expression, 20 μg of protein were distributed in 96-well plates (black plates with a transparent bottom) and the emission at 530 nm after the excitation at 500 nm with a Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) was quantified. Protein fluorescence expression was determined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only the receptor fused to RLuc or receptors fused to nRluc and cRluc. In parallel, luminescence and BRET signal was determined as the ratio of the light emitted by Venus (530 nm) over that emitted by coelenterazine H (485 nm) 1 min after the addition of 5 μM coelenterazine H (Invitrogen) using a Mithras LB940. To quantify receptor-RLuc expression, luminescence readings were also performed after 10 min of adding coelenterazine H. The net BRET was defined as [(long-wavelength emission) / (short-wavelength emission)]-cf.], where cf. corresponds to [(long-wavelength emission) / (short-wavelength emission)] for the receptor–RLuc expressed alone in the same experiment. BRET is expressed as milliBRET units (mBU; net BRET 1000). Data were fitted to a nonlinear regression equation, assuming a single-phase saturation curve with GraphPad Prism software.

G-protein activation BRET assays

BRET assays were performed to detect receptor ligand induced events for Gi/o protein activation. Gi/o protein activation assay used RLuc8-fused Gαi/o protein subunit and mVenus-fused Gγ2 protein for BRET pair. Receptor and untagged Gβ1 constructs were also co-transfected. As reported previously (Sánchez-Soto et al., 2016), cells were harvested, washed, and resuspended in phosphate-buffered saline. Approximately 200,000cells/well were distributed in 96-well plates, and 5 μM coelenterazine H (substrate for luciferase) was added to each well. One minute after the addition of coelenterazine H, ligands were added to each well, whereas antagonists were added 10 min before coelenterazine. The fluorescence of the acceptor was quantified (excitation at 500 nm and emission at 540 nm for 1-s recordings) in Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) to confirm the constant expression levels across experiments. In parallel, the BRET signal from the same batch of cells was determined as the ratio of the light emitted by mVenus (510–540 nm) over that emitted by RLuc (485 nm). G protein activation was calculated as the BRET change (BRET ratio for the corresponding drug minus the BRET ratio in the absence of the drug) observed 10 min after the addition of the ligands. BRET curves were analysed by nonlinear regression using the commercial Prism 4 (GraphPad Software).

cAMP production

For cAMP production, homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) assays were performed using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US), based on competitive displacement of a europium chelate-labelled cAMP tracer bound to a specific antibody conjugated to acceptor beads. HEK-293T cells were transfected with the indicated H_3R receptors without fusion proteins. First of all we established the optimal cell density and forskolin concentration for an appropriate fluorescent signal that covered most of the dynamic range of cAMP standard curve. Cells (2000 cells/well) growing in medium containing 50 μM zardaverine were stimulated with agonists for 15 min before adding 0.3 μM forskolin or vehicle and incubating for an additional 15-min period in white ProxiPlate 384-well microplates (PerkinElmer) at 25°C. Fluorescence at 665 nm was analysed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Lab technologies, Offenburg, Germany).

Radioligand binding experiments

Radioligand binding experiments were performed in HEK-293T cells expressing each of the H_3R-YFP isoforms at different concentrations of transient transfection. Cell suspensions were disrupted with a Polytron homogenizer (PTA 7 TS rotor, setting 3; Kinematica, Basel, Switzerland) for two 5 s-periods in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing a proteinase inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA). Membranes were obtained by centrifugation twice at 105.000 g for 45 min at 4°C. The pellet was stored at −80°C, washed once more as described above and resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use. Membrane protein was quantified by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin dilutions as standard.

Binding experiments were performed with membrane suspensions (0.2 mg of protein/mL) at room temperature in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mM $MgCl_2$. Punctual specific and non-specific binding measurements were done with several membrane samples to obtain a regression between levels of fluorescence and pmol of receptor/mg protein expressed. Membrane suspensions were incubated for 2 h with a constant free concentration of 2nM of the H_3R agonist [^{3}H]RAMH, and a totally displacing concentration of the same non-labeled ligand to determine the non-specific binding.

In all cases, free and membrane-bound ligands were separated by rapid filtration of 500 μL aliquots in a cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) through Whatman GF/C

filters embedded in 0.3% polyethylenimine that were subsequently washed for 5 s with 5 mL of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer. The filters were incubated with 10 mL of Ultima Gold MV scintillation cocktail (PerkinElmer, Boston, MA, USA) overnight at room temperature and radioactivity counts were determined using a Tri-Carb 2800 scintillation counter (PerkinElmer, Boston, MA, USA) with an efficiency of 62% (Sarrió et al., 2000).

Statistical Analysis

Data are presented as the mean ± S.E.M. and significance was analysed by non-paired, two-tailed Student's t test, One-way or Two-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's or test (see figure legends) for multiple comparisons. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

Histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413 and 415 form heteromers with the dopamine D_1 receptor

The H_3R isoform 445 has been previously shown to interact and form heteromers with D_1R, with specific biochemical properties (Ferrada et al., 2009). Since other H_3R isoforms have been found expressed in several brain areas and some of them have shown to be functional (Bongers et al., 2007; García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Nieto-Alamilla et al., 2016, 2018; Riddy et al., 2017), we wanted to test if they can also physically interact with D_1R. We performed BRET assays in HEK-293T cells with a constant amount of the D_1R fused to *Renilla Luciferasa* (Rluc) and increasing amounts of the H_3R isoforms H_3R329, H_3R365, H_3R413, H_3R415 or H_3R445 fused to yellow fluorescent protein (YFP). A positive saturable BRET signal was obtained between each of the isoforms analysed and the D_1R (Figure 1), providing evidence that D_1R can form heteromers also with other isoforms apart from H_3R445, what is consistent with the high sequence homology shared by these isoforms, as they differ only in the sequence length that codes for the third intracellular loop (ICL3), whose aminoacidic number is indicated in the name of the isoform. As a negative control, we performed in parallel similar BRET experiments but transfecting the cannabinoid CB_1 receptor fused to Rluc instead of the D_1R, without obtaining saturation curves for any of the H_3R isoforms (Supplementary Figure 1). BRET saturation curves obtained with H_3R isoforms and D_1R have shown very similar $BRET_{MAX}$ values (maximum BRET ratio level reached when all donor molecules are associated with acceptors) but some differences in their $BRET_{50}$ values (represent the acceptor/donor ratio giving the 50% of the maximum BRET signal) (Table 1). $BRET_{MAX}$ values cannot be used as a quantitative measure of the number of heteromers formed for each pair combination, since this value depends not only on the number of dimers, but also on the distance between the energy transfer proteins as well as their relative orientation within the receptor complex. Since $BRET_{50}$ value can be used as an indicative of the affinity between the receptor pair, we analysed the relative affinity for the D_1R among the H_3R isoforms comparing their $BRET_{50}$ values obtained with the BRET saturation assays. These results suggest that H_3R329 isoform exhibits the highest affinity ($BRET_{50}$=5,5 ± 0,5) for D_1R, whereas the H_3R445 isoform would have the lowest affinity ($BRET_{50}$=19 ± 4), since lower levels of $BRET_{50}$ would correspond to lower amounts of the receptor fused to YFP needed to reach the maximum level of associated receptors. To confirm this, we performed radioligand binding experiments transfecting HEK-293T cells with increasing amounts of each H_3R isoform fused to YFP, considering the kinetic parameters for all isoforms, to find a correlation between the amount of each H_3R isoform and the fluorescence levels in order to obtain the quantity of receptor that gives the 50% of

the $BRET_{MAX}$ (Supplementary Table 1). Binding results show again that the receptor levels (expressed as pmol/mg protein) needed to obtain 50% of $BRET_{MAX}$ is smaller for the isoforms with a greater deletion and it has been uncovered that the H_3R415 isoform is in fact the one with the lowest affinity to D_1R. These results point out that the expression of the ICL3 region in human H_3R gene causes a reduction in the affinity between H_3 and D_1 receptors.

H_3R-isoform bias activating distinct Gαi/o-protein subtypes

Since the H_3R isoforms analysed in this study mainly differ in the length of their ICL3, a region demonstrated to be a common binding interface for the interaction with both G proteins and β-arrestins (Feuerstein et al., 2009; Rasmussen et al., 2011), we looked for potentially different patterns of activation among diferent H_3R isoforms and investigated if the presence of the D_1R affects their biochemical properties. We first analysed their G-protein dependent signaling by G-protein activation BRET assays (see *Materials and Methods*), transfecting HEK-293T cells with one of the Gαi/o subunit subtypes (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) fused to Rluc8, the $G\beta_1$ subunit and the $G\gamma_2$ subunit fused to mVenus, along with the H_3R isoform and/or the D_1R. In this assay, when a ligand induces the activation of the heterotrimeric G protein, the resulting conformational changes turn into negative BRET signal changes, in agreement with the opening and distancing between the Gαi/o and $G\gamma_2$ subunits (Figure 2, Table 2). When cells expressing H_3R329 or H_3R365 (the H_3R isoforms with the greatest ICL3 deletion) were activated with the H_3R agonists histamine or RAMH, both showed a very low (~15-20%) relative efficacy (with respect to the activation of H_3R445 isoform with histamine) for almost all Gαi/o subtypes and even no activation for $G\alpha_{i3}$, with the exception of the Gαi2 activation by H_3R365, that exhibited a significantly higher relative efficacy (~60%) in comparison with the rest of Gαi/o subtypes. By contrast, H_3R415 isoform showed a higher relative efficacy than shorter H_3R isoforms, being total for Gαi2 and Gαi3 subtypes and about 85% for the rest of Gαi/o -protein subtypes. In relation to potency differences among Gαi/o subtypes, both H_3R329 and H_3R365 isoforms showed a markedly lower potency for Gαo1, whereas the same Gαi/o -protein subtype accounts for the higher potency exerted by H_3R415 and H_3R445 isoforms. Surprisingly, H_3R329 and H_3R365 isoforms presented its highest potency for Gαi2, the same Gαi/o subtype that allows H_3R365 to exert its highest relative efficacy. For its part, H_3R445 showed its lowest potency activating Gαi2 and Gαi3. Finally, if we compare activation profiles among H_3R isoforms for each Gαi/o -protein subtype, there is a similar pattern that consists of a higher potency and a lower efficacy for the most deleted H_3R329 and H_3R365 isoforms, whereas H_3R415 and H_3R445 isoforms show lower potencies and the highest efficacies, except for the Gαo1 subunit, which has just the opposite pattern in relation to potency differences. These results indicate that isoforms with the longest ICL3 region, H_3R415 and H_3R445, would be more potent and efficacious activating the Gαo1 subunit, the most abundant Gαi/o subtype in brain tissue, whereas isoforms with the shortest ICL3 region, H_3R329 and H_3R365, would activate preferentially G-proteins containing Gαi2 subunits.

When each H_3R isoform was co-transfected with D_1R (Table 3), activation of H_3R329 and H_3R365 isoforms with H_3R agonists showed, in comparison with the absence of D_1R (Table 2), an inversion of their Gαi/o-activation profiles, since they showed their best potency for Gαo1 and their worst for Gαi2, whereas in the case of H_3R415 and H_3R445 isoforms D_1R did not affect H_3R-agonist potencies for any Gαi/o-subunit subtype. On the other hand, for D_1R-H_3R co-transfections we expressed efficacies as the percentage of increase or decrease respect the effect displayed by the H_3R445 isoform in the absence of D_1R, in order to analyse the effect of D_1R-H_3R heteromerization, allowing the comparison of efficacies between

Table 2 and 3. We observed, for all H_3R isoforms and all Gαi/o-subunit subtypes, a clear increase in efficacy, and the most significant were observed in H_3R329 for Gαo1 (2 infolds), in H_3R365 for Gαo2 and Gαi1 (1.6 and 1.5 infolds), in H_3R415 for Gαo1 (1.4 infolds) and in H_3R445 for Gαi2 and Gαi3 (2 and 1.4 infolds). However, comparisons between systems transfected with or without D_1R must be taken as a tendency and not as a total effect, because we do not control the stoichiometry of homomers versus heteromers in the D_1R-H_3R co-transfected systems, although the receptor levels are similar among systems transfected with different Gαi/o-subtypes (data not shown). Thus, the detected differences would be a consequence of D_1R co-transfection, but since part of the signaling can come from homomeric receptor complexes and in different proportions, it would mean that the real potential effect of D_1R heteromerization with H_3R could be masked, at least partially, by this technique.

Finally, we tested if there is a correlation between the isoform bias observed by Gi-protein activation BRET assays and the final cellular levels of cAMP accumulation. HEK-293T cells, which have been reported to endogenously express Gαi1, Gαi2 and Gαi3 protein subtypes, with higher levels of Gαi2 and Gαi3 (Atwood et al., 2011), were transfected with each H_3R isoform construct without fusion proteins. RAMH was able to markedly (40%) inhibit the forskolin-induced cAMP production at H_3R415 and H_3R445 isoforms, whereas RAMH inhibition was slightly lower for H_3R365 (17,5%) and almost undetectable for H_3R329 isoforms (Figure 3). In agreement with the worst potency showed by histamine compared with RAMH in Gi-protein activation BRET assays, histamine showed a lower inhibition of cAMP production when it was applied at the same concentration as RAMH. In addition, when we treated cells with the selective H_3R inverse agonist thioperamide, before forskolin addition, the previously described constitutive activity of H_3R (Arrang et al., 2007; Morisset et al., 2000; Nieto-Alamilla et al., 2016; Schlicker and Kathmann, 2017) was evident for all isoforms, being higher for H_3R365, as it was also previously determined (Bongers et al., 2007). In global, the cAMP accumulation results are in concordance of those obtained analysing Gαi/o-protein activation and provides reliability to G-protein BRET assay as a good approach to study this signaling pathway.

H_3R-isoform bias at the level of β-arrestin recruitment

We also analysed if H_3R isoforms manifest different patterns of activation at the level of β-arrestin recruitment, since the interaction interface between receptors and β-arrestin also involves the ICL3 region of H_3R isoforms, and if their β-arrestin-recruitment profile is affected by the presence of D_1R. To achieve this, we performed BRET experiments in HEK-293T cells with a constant amount of each H_3R isoform (H_3R329, H_3R365 and H_3R445) fused to YFP and a constant amount of protein β-arrestin I fused to Rluc, taking BRET readings 10 minutes after the activation with H_3R agonists. Neither H_3R329 nor H_3R365 isoforms were able to induce β-arrestin I recruitment by any of the H_3R agonists tested, whereas H_3R445 isoform showed a significant increased BRET signal when it was activated by the endogenous ligand histamine or by imetit (Figure 4). Surprisingly, the H_3R agonist RAMH did not induce β-arrestin I recruitment with the H_3R445 isoform (Figure 4), whereas it has shown its ability to activate all Gαi/o subtypes (Table 2) and also to induce cAMP production (Figure 3, Ferrada et al., 2009). In addition, D_1R co-transfection causes not only the disappearance of the biased agonism displayed by RAMH acting on H_3R445, but also the acquisition of the ability to recruit β-arrestin I by H_3R329 and H_3R365 isoforms (Figure 5), probably because of the D_1R-H_3R heteromerization, since D_1R alone is able to recruit β-arrestin I after its activation with the D_1-like receptor agonists SKF 81297 and SKF 38393 (Supplementary Figure 2). β-arrestin I recruitment mediated by D_1R-H_3R445 exhibits the

previously reported mutual inhibition when both receptors are activated by agonists (negative cross-talk) and when the activation by agonists of one receptor is inhibited by the antagonist of the partner receptor in the heteromer (cross-antagonism) (Figure 5) (Moreno et al., 2014). Moreover, this reciprocal inhibition, that represents the molecular fingerprint of the D_1R-H_3R445 heteromer, was also observed when D_1R-H_3R329 and D_1R-H_3R365 heteromers were co-activated (Figure 5). All results obtained in the absence of D_1R reveal the existence of an agonist-directed biased signaling through H_3R445 and show again an H_3R-isoform biased signaling, in this case at the level of β-arrestin I recruitment and in accordance with the involvement of ICL3 region in the receptor-β-arrestin interactions. Remarkably, both forms of biased signaling become modulated by the presence of D_1R, resulting in their disappearance.

Histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413 and 415 form heteromers with glutamate NMDA receptors and heterotrimeric complexes with NMDAR and D_1R

Since we had previously reported the existence of both receptor complexes composed of the H_3R445 isoform and NMDAR and receptor complexes formed by H_3R445, NMDAR and D_1R (Rodríguez-Ruiz et al., 2016), we also wanted to explore if other H_3R isoforms could also do it and with which degree of affinities. We performed BRET experiments in HEK-293T cells in parallel to those of Figure 1 transfecting, on one hand, a constant amount of two subunits of the NMDAR (NR1A fused to Rluc and NR2B) and increasing amounts of the H_3R isoforms H_3R329, H_3R365, H_3R413, H_3R415 or H_3R445 fused to YFP (Figure 6). On the other hand, we transfected the same constructs but, instead of NR1A-Rluc, the D_1R fused to one half of the Rluc (nRluc) and the NR1A subunit fused to the other half (cRluc), in order to be sure that the bimolecular complemented luminescence comes from D_1R-NMDAR heteromerization (Figure 7). A positive saturable BRET was obtained for each H_3R isoform in both transfection systems, providing evidence that all H_3R isoforms can form heteromers with NMDAR and heterotrimeric complexes where D_1R is also present.

Next, we wanted to analyse if the length differences in the ICL3 of H_3R isoforms affect their affinity to form complexes with NMDAR or with both NMDAR and D_1R. Using the correlations between fluorescence and receptor expression levels obtained by radioligand binding experiments, we calculated for each H_3R isoform the receptor amount needed to reach the 50% of the $BRET_{MAX}$ (Supplementary Table 1). Differences observed in H_3-isoform receptor levels at $BRET_{50}$ indicate that the H_3R329 and the H_3R415 isoforms have the highest and the lowest affinities for NMDAR, respectively, not only in complexes formed by H_3R isoforms and NMDAR but also in complexes that include the D_1R. Overall, the affinity pattern displayed among H_3R isoforms were the same for D_1R as for D_1R-NMDAR complexes, but slightly different for NMDAR, where the H_3R445 isoform shows a higher relative affinity than the H_3R413 or H_3R415 isoforms (Supplementary Table 1). Finally, if we compare the amount of each H_3R isoform at $BRET_{50}$ between complexes with D_1R and complexes with NMDAR, results suggest that H_3R329 isoform would have a similar affinity for D_1R and for NMDAR, whereas the rest of H_3R isoforms seems to have more affinity for NMDAR than for D_1R, since less receptor levels are needed to reach the 50% of the $BRET_{MAX}$.

DISCUSSION

The existence of different isoforms of the H_3R, with different pharmacological profiles, may have high relevance to the *in vivo* histaminergic signaling, including the apparently non-

functional isoforms, since they could be acting as modulators of the expression of the functional isoforms, as it has been described for some non-functional rat H_3R isoforms (Bakker et al., 2006) or they could have some degree of constitutive activity (Bongers et al., 2007; Rouleau et al., 2002) important for the basal tone of histaminergic signaling, although they could seem to be less or non-functional when activated by H_3R agonists. Thus, in this work we have analysed the pharmacological and functional differences among four H_3R isoforms that mainly differ in the length of their ICL3 region, which has been confirmed to be decisive for their effectors coupling and activation. H_3R isoforms with shorter ICL3 region, H_3R329 and H_3R365, have shown very low or no activation of two main signaling pathways of GPCRs, G-protein and β-arrestin dependent pathways, respectively, compared to the H_3R isoforms with longer ICL3 regions, H_3R415 and H_3R445, a phenomenon that has been proposed as "isoform bias" (Riddy et al., 2017).

Since different Gαi/o protein subtypes have been described, with differential distribution patterns at tissue and cellular level (Wettschureck and Offermanns, 2005), and because the distinct generated KO have shown unique deficiencies (Jiang et al., 1998), it is supposed that each Gαi/o subtype can have distinct biological functions and that they are not simple isoforms. By G-protein activation BRET assays, we have provided evidence of the different profiles of Gαi/o-protein activation exerted by histamine and by the H_3R agonist RAMH through their binding to these four H_3R isoforms. The short isoforms H_3R329 and H_3R365 have a clear preference activating G proteins containing Gαi2 subunits and have shown their worst potency activating Gαo1 proteins, whereas the long isoforms H_3R415 and H_3R445 surprisingly have shown opposed activating preferences, exhibiting their best potency for Gαo1 and their worst for Gαi2 (and Gαi3). In terms of efficacy, short isoforms have shown a markedly low activation, compared with long isoforms, of all Gαi/o subtypes except for Gαi2 in the case of the H_3R365 isoform, which may mainly account for its previously reported functionality (Bongers et al., 2007; Riddy et al., 2017; Wellendorph et al., 2002). In general, we have observed that H_3R agonists are more potent and less effective activating short than long isoforms, except for the Gαo1 subunit, for which potencies have an inverted profile. This means that, when Gαo1-containing G proteins are expressed in a cell with relative high levels, long isoforms will be more potent and more effective than shorter isoforms, whereas it would be on the contrary when Gαo1 subunit is not expressed or has low relative levels compared to other Gαi/o subunits. Thus, depending on the Gαi/o subunit expression profile of the cell, the H_3R isoforms expressed (which in turns can vary among different cerebral regions) would show different pharmacological profiles, which *in vivo* may confer a higher level of neurotransmission regulation by the histaminergic system.

In addition, the obtained cellular cAMP levels are in concordance with the isoform bias observed by Gαi/o-protein activation BRET assays, providing reliability to this technique for the study of the G-protein/cAMP signaling pathway, always taking into high consideration the cell line used. HEK-293T cell line is a suitable tool for the study of this pathway, since it endogenously expresses mainly the Gαi1, Gαi2 and Gαi3 protein subtypes (Atwood et al., 2011), which have been described to be implied in the inhibition of adenylyl cyclase, whereas this cell line show statistically nonsignificant expression levels of Gαo1 and Gαo2, which have as preferential effectors calcium, sodium and potassium channels (Cohen-Armon and Sokolovsky, 1993; Liu et al., 1994; VanDongen et al., 1988). cAMP determination assays have also evinced the existence of constitutive activity in all H_3R isoforms, being slightly higher in the case of H_3R365, as it was previously described (Bongers et al., 2007). This high constitutive activity of the H_3R365 isoform has been proposed to be responsible to a great extent of the tonic inhibition observed in the firing frequency of histaminergic neurons, in which inverse agonists as thioperamide have shown to increase this frequency (Arrang et al., 2007; Eriksson et al., 2004; Stevens et al., 2001).

Another mechanism of regulation of the neuronal signaling by H_3R isoforms, besides their pharmacological and functional differences or their different cellular and cerebral patterns of expression, may be due to their interactions with other proteins and the possible consequent changes in their signaling. Thus, we have also studied the ability of H_3R isoforms to interact with other receptors, as it was previously reported for the H_3R445 isoform with D_1R and NMDAR (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011, 2014; Rodríguez-Ruiz et al., 2016). We have not only observed the feasibility of H_3R isoforms to form heteromers with D_1R, with NMDAR and with both receptors simultaneously, showing different degree of affinities among H_3R isoforms, but we have also observed some important signaling changes as a consequence of their heteromerization with D_1R. In Gαi/o-protein mediated signaling, the presence of D_1R has shown a general improvement of histaminergic signaling to all H_3R isoforms, either by the improvement of the H_3R agonists potency, efficacy or both. In particular, it is noteworthy that D_1R co-transfection has caused the disappearance of the inverted profile of H_3R isoforms activating Gαo1 proteins, since D_1R has conferred a substantial increase in potency to the short isoforms, which besides are the isoforms that have shown a significantly higher affinity for D_1R. Of equal importance, results from β-arrestin recruitment experiments show how D_1R co-transfection has provided the ability to recruit β-arrestin I to the shorter isoforms H_3R329 and H_3R365, which were unable to do it in the absence of D_1R, and also to the H_3R agonist RAMH acting on H_3R445, causing the disappearance of both the ligand- and the H_3R-isoform bias.

Finally, we have proved that $BRET_{50}$ values obtained by BRET saturation assays need to be referred to the equivalent receptor expression levels, since fluorescence levels may vary because of different adopted conformations of the fluorescent molecule depending on the receptor fused and on the probable differential interaction of these receptors with other proteins in the cell. In fact, our results show that the relative affinities inferred from $BRET_{50}$ values are not exactly equivalent to the deduced affinities from correlations with the real receptor expression levels, especially for the H_3R445 isoform.

In summary, our results show the existence of an H_3R-isoform bias at the level of Gαi/o-protein activation, cAMP production and β-arrestin I recruitment, which may represent an important mechanism for the histaminergic regulation of global neurotransmission, since it has been described that H_3R, probably by the H_3R365 and H_3R413 isoforms, can act not only as an autoreceptor but also as an heteroreceptor in neuronal presynaptic terminals (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Gbahou et al., 2012; Haas et al., 2008; Nieto-Alamilla et al., 2016; Schlicker and Kathmann, 2017). In addition, the demonstrated interactions between H_3R isoforms and D_1R and/or NMDAR, has shown the importance of receptor heteromerization, which will add another degree of signaling regulation that should be taken into account in the design of new histaminergic drugs, which should be developed considering as a target not only the brain region of interest, with a specific H_3R-isoform expression profile, but also H_3R-containing heteromers as the real molecular pharmacological targets.

REFERENCES

Arrang, J.M., Garbarg, M., and Schwartz, J.C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. Nature *302*, 832–837.

Arrang, J.-M., Morisset, S., and Gbahou, F. (2007). Constitutive activity of the histamine H3 receptor. Trends Pharmacol. Sci. *28*, 350–357.

Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. BMC Genomics *12*, 14.

Bakker, R.A. (2004). Histamine H3-receptor isoforms. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *53*, 509–516.

Bakker, R.A., Lozada, A.F., Marle, A. van, Shenton, F.C., Drutel, G., Karlstedt, K., Hoffmann, M., Lintunen, M., Yamamoto, Y., Rijn, R.M. van, et al. (2006). Discovery of Naturally Occurring Splice Variants of the Rat Histamine H3 Receptor That Act as Dominant-Negative Isoforms. Mol. Pharmacol. *69*, 1194–1206.

Blandina, P., and Passani, M. (2016). Histamine Receptors: Preclinical and Clinical Aspects.

Bongers, G., Krueger, K.M., Miller, T.R., Baranowski, J.L., Estvander, B.R., Witte, D.G., Strakhova, M.I., van Meer, P., Bakker, R.A., Cowart, M.D., et al. (2007). An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H3 isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. *323*, 888–898.

Cogé, F., Guénin, S.P., Audinot, V., Renouard-Try, A., Beauverger, P., Macia, C., Ouvry, C., Nagel, N., Rique, H., Boutin, J.A., et al. (2001). Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. Biochem. J. *355*, 279–288.

Cohen-Armon, M., and Sokolovsky, M. (1993). Evidence for involvement of the voltage-dependent Na+ channel gating in depolarization-induced activation of G-proteins. J. Biol. Chem. *268*, 9824–9838.

Eriksson, K.S., Sergeeva, O.A., Selbach, O., and Haas, H.L. (2004). Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. Eur. J. Neurosci. *19*, 1278–1284.

Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., et al. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *157*, 64–75.

Feuerstein, S.E., Pulvermüller, A., Hartmann, R., Granzin, J., Stoldt, M., Henklein, P., Ernst, O.P., Heck, M., Willbold, D., and Koenig, B.W. (2009). Helix formation in arrestin accompanies recognition of photoactivated rhodopsin. Biochemistry (Mosc.) *48*, 10733–10742.

García-Gálvez, A.M., and Arias-Montaño, J.A. (2016). [Isoforms of the human histamine H3 receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications]. Gac. Med. Mex. *152*, 94–102.

Gbahou, F., Rouleau, A., and Arrang, J.-M. (2012). The histamine autoreceptor is a short isoform of the H3 receptor. Br. J. Pharmacol. *166*, 1860–1871.

Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 121–130.

Haas, H.L., Sergeeva, O.A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. Physiol. Rev. *88*, 1183–1241.

Hu, W., and Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. Pharmacol. Ther. *175*, 116–132.

Jiang, M., Gold, M.S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G., and Birnbaumer, L. (1998). Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 3269–3274.

Leurs, R., Bakker, R.A., Timmerman, H., and de Esch, I.J.P. (2005). The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. Nat. Rev. Drug Discov. *4*, 107–120.

Liu, Y.F., Jakobs, K.H., Rasenick, M.M., and Albert, P.R. (1994). G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G0 and Gi2 in GH4C1 pituitary cells. J. Biol. Chem. *269*, 13880–13886.

Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., and Erlander, M.G. (1999). Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. Mol. Pharmacol. *55*, 1101–1107.

Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepúlveda, M., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P.J., Canela, E.I., et al. (2011). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. J. Biol. Chem. *286*, 5846–5854.

Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ1-D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 3545–3558.

Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. Nature *408*, 860–864.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 18676–18681.

Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.-M., Morales-Figueroa, G.-E., and Arias-Montaño, J.-A. (2016). The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. Mol. Pharmacol. *90*, 649–673.

Nieto-Alamilla, G., Escamilla-Sánchez, J., López-Méndez, M.-C., Molina-Hernández, A., Guerrero-Hernández, A., and Arias-Montaño, J.-A. (2018). Differential expression and signaling of the human histamine H3 receptor isoforms of 445 and 365 amino acids expressed in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. J. Recept. Signal Transduct. Res. *38*, 141–150.

Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. Neuroscience *114*, 173–193.

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex. Nature *477*, 549–555.

Riddy, D.M., Cook, A.E., Diepenhorst, N.A., Bosnyak, S., Brady, R., Mannoury la Cour, C., Mocaer, E., Summers, R.J., Charman, W.N., Sexton, P.M., et al. (2017). Isoform-Specific Biased Agonism of Histamine H3 Receptor Agonists. Mol. Pharmacol. *91*, 87–99.

Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., et al. (2016). Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. Mol. Neurobiol.

Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). Histamine H3-receptor-mediated [35S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *135*, 383–392.

Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N.S., Ellenberger, M.P., Newman, A.H., Ferré, S., and Yano, H. (2016). Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. Mol. Pharmacol. *89*, 457–466.

Schlicker, E., and Kathmann, M. (2017). Role of the Histamine H3Receptor in the Central Nervous System. Handb. Exp. Pharmacol. *241*, 277–299.

Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol. Rev. *71*, 1–51.

Stevens, D.R., Eriksson, K.S., Brown, R.E., and Haas, H.L. (2001). The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. Behav. Brain Res. *124*, 105–112.

VanDongen, A.M., Codina, J., Olate, J., Mattera, R., Joho, R., Birnbaumer, L., and Brown, A.M. (1988). Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein Go. Science *242*, 1433–1437.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., and Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. Brain Res. *295*, 13–25.

Wellendorph, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R., and Weiner, D.M. (2002). Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H(3) receptor. Neuropharmacology *42*, 929–940.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol. Rev. *85*, 1159–1204.

Table 1. BRET parameters obtained from BRET saturation curves depicted in Figures 1, 6 and 7.

	D_1R-Rluc		NR1A-Rluc + NR2B		NR1A-cRluc + NR2B + D1R-nRluc	
	$BRET_{MAX}$	$BRET_{50}$	$BRET_{MAX}$	$BRET_{50}$	$BRET_{MAX}$	$BRET_{50}$
H_3R329-YFP	32.7 ± 0.9	5.5 ± 0.5***	263.5 ± 3.6***	1.90 ± 0.15**	219.1 ± 7.5***	3.16 ± 0.44
H_3R365-YFP	32.0 ± 1.1	7.2 ± 0.8**	257.5 ± 3.9***	1.78 ± 0.19*	210.8 ± 8.0***	2.51 ± 0.51
H_3R413-YFP	42.3 ± 3.3	12.5 ± 2.2	135.8 ± 2.5***	1.30 ± 0.17	130.8 ± 6.8	2.10 ± 0.49
H_3R415-YFP	38.8 ± 3.5	12.9 ± 2.8	136.4 ± 2.2***	1.57 ± 0.18	130.2 ± 6.2	3.12 ± 0.55
H_3R445-YFP	41.0 ± 3.8	19.4 ± 3.8	68.1 ± 2.4	0.96 ± 0.23	115.1 ± 6.1	4.12 ± 0.85

$BRET_{MAX}$ and $BRET_{50}$ values ± S.E.M. obtained from $BRET^1$ saturation curves between H_3R isoforms and D_1R (Figure 1), NMDAR (Figure 6) or D_1R and NMDAR (Figure 7) from 7 to 10 different experiments performed in transfected HEK-293T cells. For each parameter $BRET_{MAX}$ or $BRET_{50}$, statistical differences between H_3R isoforms versus H_3R445 isoform were calculated calculated by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

Table 2. Potency and efficacy of histamine and RAMH obtained from G-protein activation BRET assays mediated by four different H_3R isoforms coupled to five distinct Gαi/o protein subtypes

Gα subunit	H_3R agonist	H_3R329		H_3R365		H_3R415		H_3R445	
		EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)
$Gα_{o1}$	HISTAMINE	68 ± 14**###	16 ± 4***	12 ± 8	23 ± 3***	4 ± 1	87 ± 3*	10 ± 1	100 ± 3
	RAMH	3 ± 2	23 ± 3***	0.18 ± 0.17	10 ± 3***	1 ± 0.75	83 ± 3*	2.1 ± 0.5	102 ± 5
$Gα_{o2}$	HISTAMINE	3 ± 1*	17.7 ± 6***	0.7 ± 0.5**	15 ± 13***	13 ± 2	82 ± 2	17 ± 2	100 ± 2
	RAMH	0.8 ± 0.1	19 ± 4***	0.5 ± 0.4	13 ± 4***	9 ± 2**	80 ± 2**	2.3 ± 0.5	99 ± 2
$Gα_{i1}$	HISTAMINE	7 ± 4	19 ± 11***	5 ± 3	23 ± 11***	18 ± 5	89 ± 4	17 ± 3	100 ± 4
	RAMH	0.9 ± 0.4	20 ± 7***	0.4 ± 0.3	20 ± 16***	1.4 ± 0.3	99 ± 3	1.8 ± 0.3	105 ± 7
$Gα_{i2}$	HISTAMINE	3 ± 3*	27 ± 20**	0.12 ± 0.04*	65 ± 6#	10 ± 2	97 ± 3	25 ± 5**	100 ± 1
	RAMH	1.2 ± 0.9	22 ± 12*	0.004 ± 0.003	61 ± 30#	7 ± 2	107 ± 3	3.1 ± 0.4	112 ± 1
$Gα_{i3}$	HISTAMINE	ND	ND	ND	ND	13 ± 7	110 ± 8	21 ± 5	100 ± 2
	RAMH	ND	ND	ND	ND	10 ± 4*	115 ± 5	3.1 ± 0.9	118 ± 15

Potency (EC_{50} values, in nM) and relative efficacy (E_{MAX} values, as the percentage of histamine values displayed by the H_3R445 isoform) of histamine and the H_3R selective agonist RAMH obtained from G-protein activation BRET experiments mediated by H_3R329, H_3R365, H_3R415 and H_3R445 coupled to the different Gαi/o protein subtypes (Figure 2 shows representative curves obtained with histamine for the four H_3R isoforms).
E_{MAX} and EC_{50} values were obtained from a sigmoidal concentration-response function adjusted by non-linear regression analysis and are expressed as means ± SEM of 3 experiments performed in triplicate.
For each parameter (E_{MAX} or EC_{50}):

- statistical differences between histamine or RAMH curves among the different H_3R isoforms for each Gαi/o protein subtype were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test versus parameters from H_3R445 isoform (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$)
- statistical differences between histamine or RAMH curves for each H_3R isoform among Gαi/o protein subtypes were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test versus the Gαi/o subtype with the lowest EC_{50} or E_{MAX} value ($^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$)

ND= not detectable

Table 3. Potency and efficacy of histamine and RAMH obtained from G-protein activation BRET assays mediated by four different H_3R isoforms coupled to five distinct Gαi/o protein subtypes in the presence of D_1R

Gα subunit	H_3R agonist	D_1R							
		H_3R329		H_3R365		H_3R415		H_3R445	
		EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)	EC_{50} (nM)	E_{MAX} (%)
$Gα_{o1}$	HISTAMINE	0.32 ± 0.15***	32 ± 2***	0.15 ± 0.07***	30 ± 2***	6.6 ± 1.05**	120 ± 2** ###	12 ± 1	132 ± 2###
	RAMH	0.28 ± 0.17***	20 ± 2***	0.18 ± 0.07***	29 ± 1***	0.85 ± 0.1***	126 ± 2	2.8 ± 0.3**	129 ± 1##
$Gα_{o2}$	HISTAMINE	1.2 ± 0.7***	23 ± 8***	0.13 ± 0.08***	24 ± 11***	9 ± 1**	108 ± 1	16 ± 2	112 ± 2#
	RAMH	5.3 ± 3	18 ± 10***	0.06 ± 0.04	21 ± 9***	0.36 ± 0.09	116 ± 2	2.7 ± 0.4*	120 ± 2
$Gα_{i1}$	HISTAMINE	2.5 ± 1.5	22 ± 9***	0.41 ± 0.28*	35 ± 10***	14.2 ± 4.6	97 ± 5	12 ± 2	101 ± 2
	RAMH	0.15 ± 0.12*	24 ± 12***	0.07 ± 0.04*	35 ± 11***	2.2 ± 0.4* #	120 ±3	1.2 ± 0.1	111 ± 2
$Gα_{i2}$	HISTAMINE	7.1 ± 4.3**	21 ± 11***	0.53 ± 0.2**	78 ± 5*** ##	14.5 ± 2.7	128 ± 2*** ###	27 ± 4*	210 ± 2###
	RAMH	0.88 ± 0.5**	24 ± 9***	0.29 ± 0.1**	53 ± 5*** #	2.9 ± 0.6##	139 ± 3*** ###	4.3 ± 0.8***	219 ± 2###
$Gα_{i3}$	HISTAMINE	ND	ND	ND	ND	8.2 ± 2.6*	120 ± 3* ###	33 ± 7***	141 ± 4###
	RAMH	ND	ND	ND	ND	0.87 ± 0.24*	131 ± 3##	4.5 ± 1.2***	132 ± 5##

Potency (EC_{50} values, in nM) and relative efficacy (E_{MAX} values, as the percentage of histamine values displayed by the H_3R445 isoform in the absence of D_1R, see Table 2) of histamine and the H_3R selective agonist RAMH obtained from G-protein activation BRET experiments mediated by D_1R and H_3R329, H_3R365, H_3R415 or H_3R445 coupled to the different Gαi/o subtypes (Figure 2 shows representative curves obtained with histamine for the four H_3R isoforms).
E_{MAX} and EC_{50} values were obtained from a sigmoidal concentration-response function adjusted by non-linear regression analysis and are expressed as means ± SEM of 3 to 5 experiments performed in triplicate.
For each parameter (E_{MAX} or EC_{50}):

- statistical differences between histamine or RAMH curves among the different H_3R isoforms for each Gαi/o protein subtype were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test versus parameters from H_3R445 isoform (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001), except for subunit Gαi3 that statistical differences between H_3R415 and H_3R445 isoforms were calculated by non-paired, two-tailed Student's t test (*p < 0.05).

- statistical differences between histamine or RAMH curves for each H_3R isoform among Gαi/o protein subtypes were calculated by one-way ANOVA, followed by Dunnett's post hoc test versus the Gαi/o subtype with the lowest EC_{50} or E_{MAX} value (#p < 0.05; ##p < 0.01; ###p < 0.001)

ND= not detectable

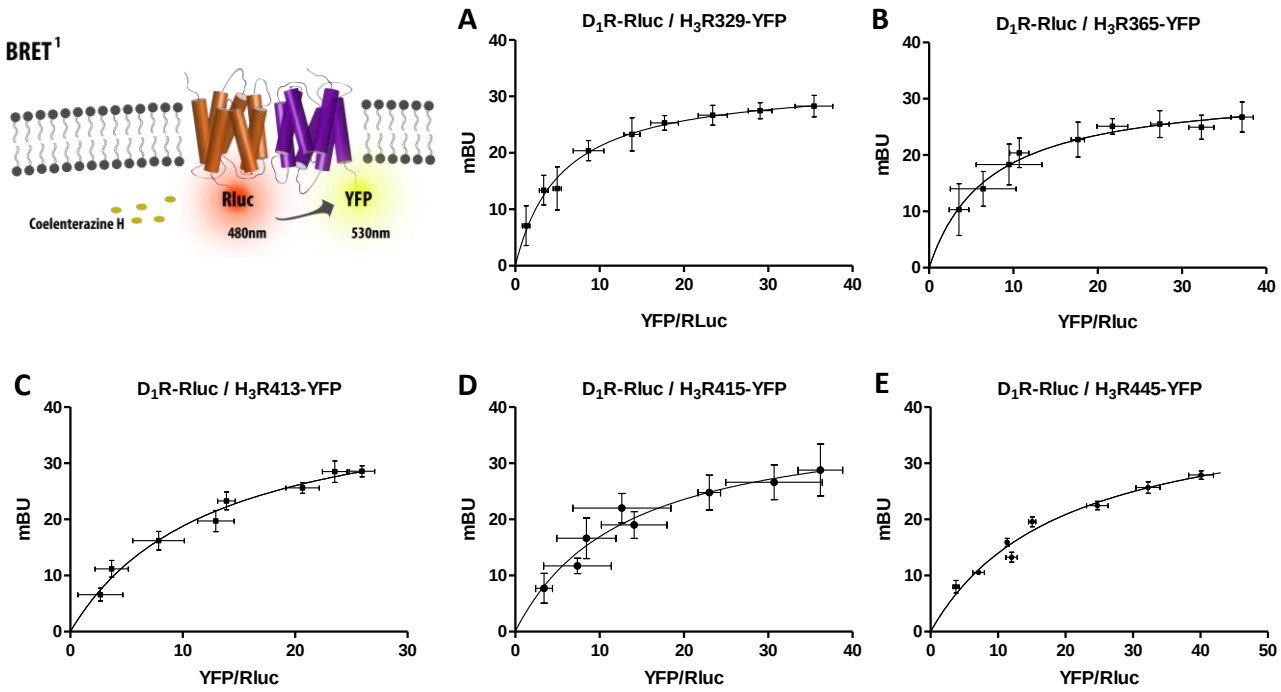


Figure 1. Dopamine D_1 receptor form heteromers with histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413, 415 and 445 in HEK-293T cells. BRET[1] experiments were performed with HEK-293T cells co-expressing D_1R–Rluc and each H_3R-isoform–YFP: H_3R329 **(A)**, H_3R365 **(B)**, H_3R413 **(C)**, H_3R415 **(D)** and H_3R445 **(E)**. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid–YFP (0.1–5 µg of each cDNA) whereas the Rluc levels have been maintained constant (0.2 µg of each cDNA). Both fluorescence and luminiscence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 100.000-150.000 luminescent units) while monitoring the increase of acceptor expression (1000–70.000 fluorescent units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc) x 1000. BRET data are expressed as means of 7 different experiments performed in duplicate. Negative controls are shown in Supplementary Figure 1

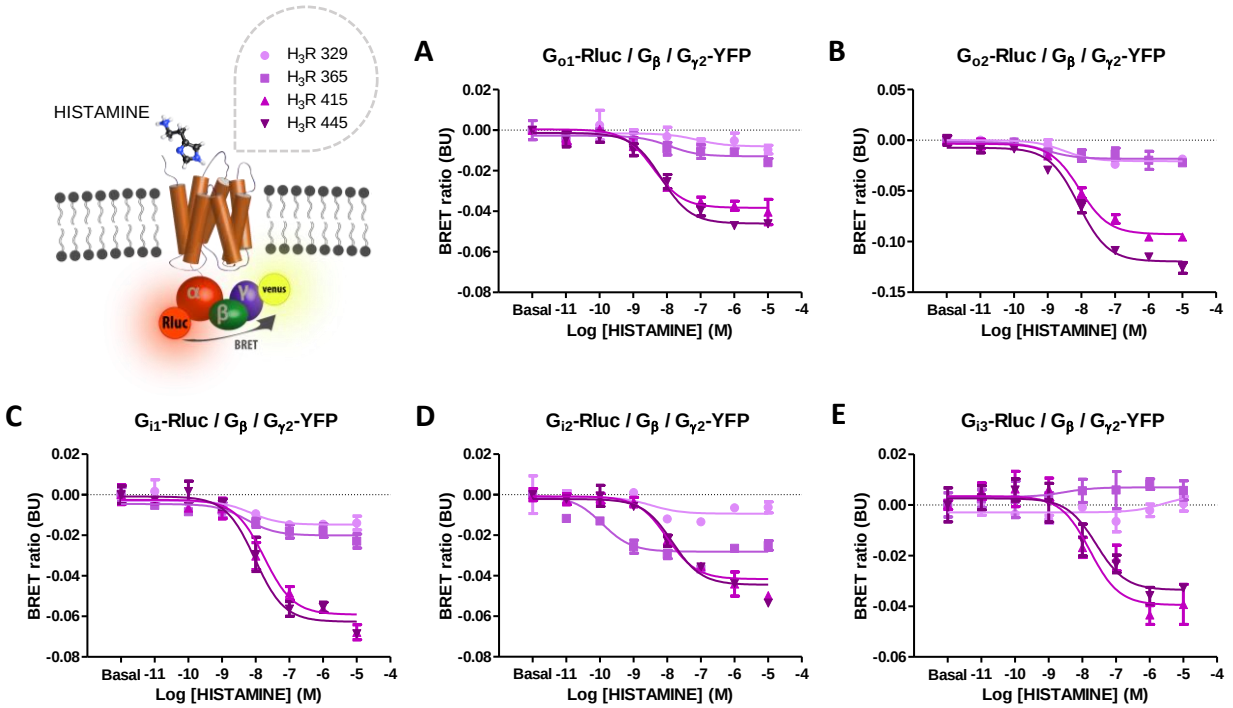


Figure 2. $G\alpha_{i/o}$-protein subtype pharmacological profiles of histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 415 and 445 determined by G-protein activation BRET assays. HEK-293T cells were transiently transfected with each H_3R isoform together with each Gαi/o subtype (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) fused to Rluc (**A,B,C,D,E,** respectively), an unfused Gβ1 subunit and a Gγ2-mVenus subunit. G-protein activation BRET assays were performed as described in *Materials and Methods* section, treating each transfected cell system with increasing concentrations of histamine or the H_3R-selective agonist RAMH. Results were fitted by nonlinear regression to a sigmoidal dose-response relationship against the ligand concentration. The graphs are representative of histamine treatments performed at least in three independent experiments with triplicate samples (error bars=S.E.M.). The diagram indicates the constructs expressed: H_3R isoform (brown), Gαi/o subunit fused to Rluc (red), Gβ1 (green) and Gγ2 (blue) fused to mVenus (yellow) subunits; the arrow represents the energy transfer.

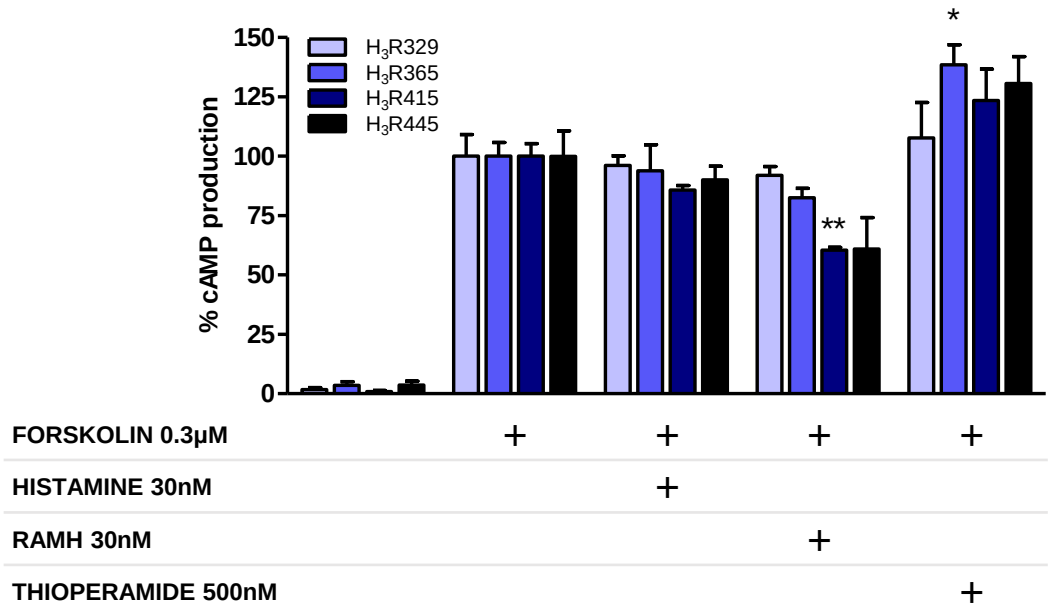


Figure 3. Histamine H_3 receptor isoforms bias at Gαi-protein dependent inhibition of cAMP production. HEK-293T cells were transiently transfected with 3 μg of each H_3R isoform 329, 365, 415 and 445 without fusion proteins. cAMP cellular levels were determined after 15 minutes stimulation with the H_3R agonists histamine (30nM) or RAMH (30nM) or the antagonist thioperamide (500nM) prior to 15 minutes treatment with 0.3 μM forskolin. Values are presented as percentage respect to forskolin treatment (mean±S.E.M. of n=3 experiments performed in triplicates). One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed a significant (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$) effect over forskolin single treatment.

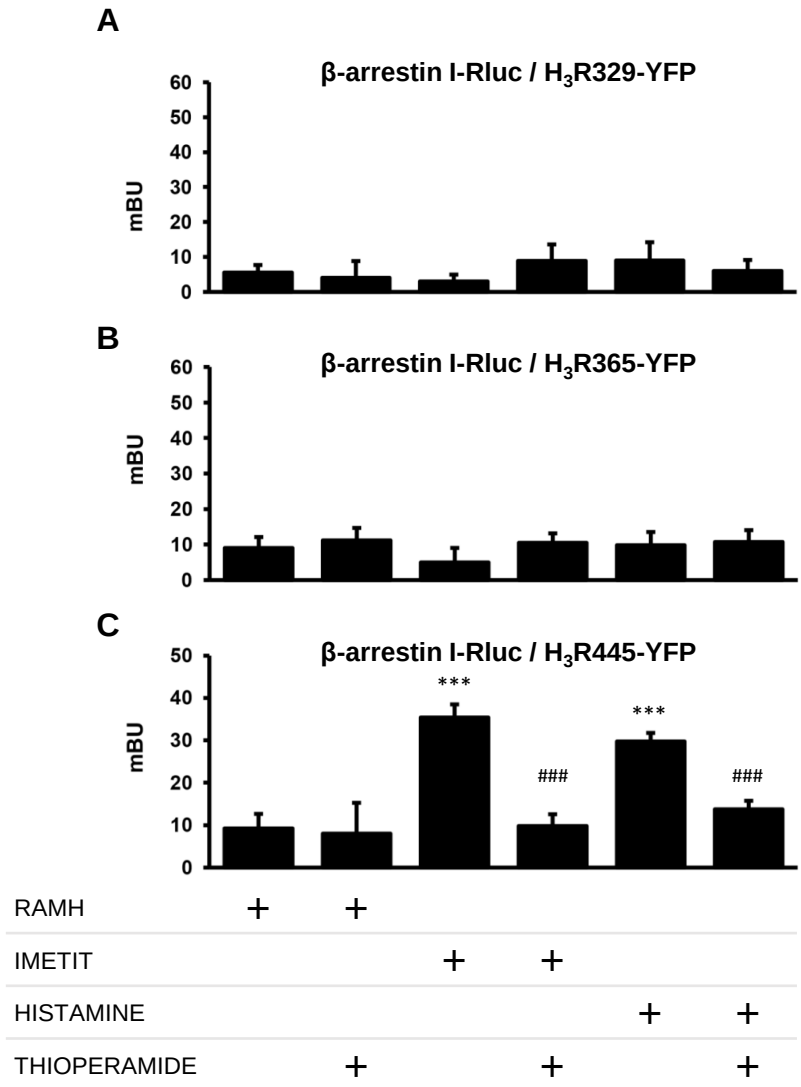


Figure 4. Histamine H_3 receptor isoforms bias at β-arrestin I recruitment. HEK-293T cells were transiently transfected with 1μg of β-arrestin I-Rluc and 3 μg of each H_3R isoform-YFP 329 **(A)**, 365 **(B)** and 445 **(C)** and β-arrestin I recruitment was measured by BRET assays. Cells were not treated (BRET ratio<10) or treated with 10μM of thioperamide before 10 minutes of 1μM treatment with RAMH, imetit or histamine. Values represent mean±S.E.M. (n=4). In cell systems transfected with H_3R445 isoform, one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed a significant effect over basal (***$p < 0.001$) and Bonferroni post hoc test showed a significant effect comparing treatments of antagonist plus agonist over the agonist single treatment ($^{###}p < 0.001$).

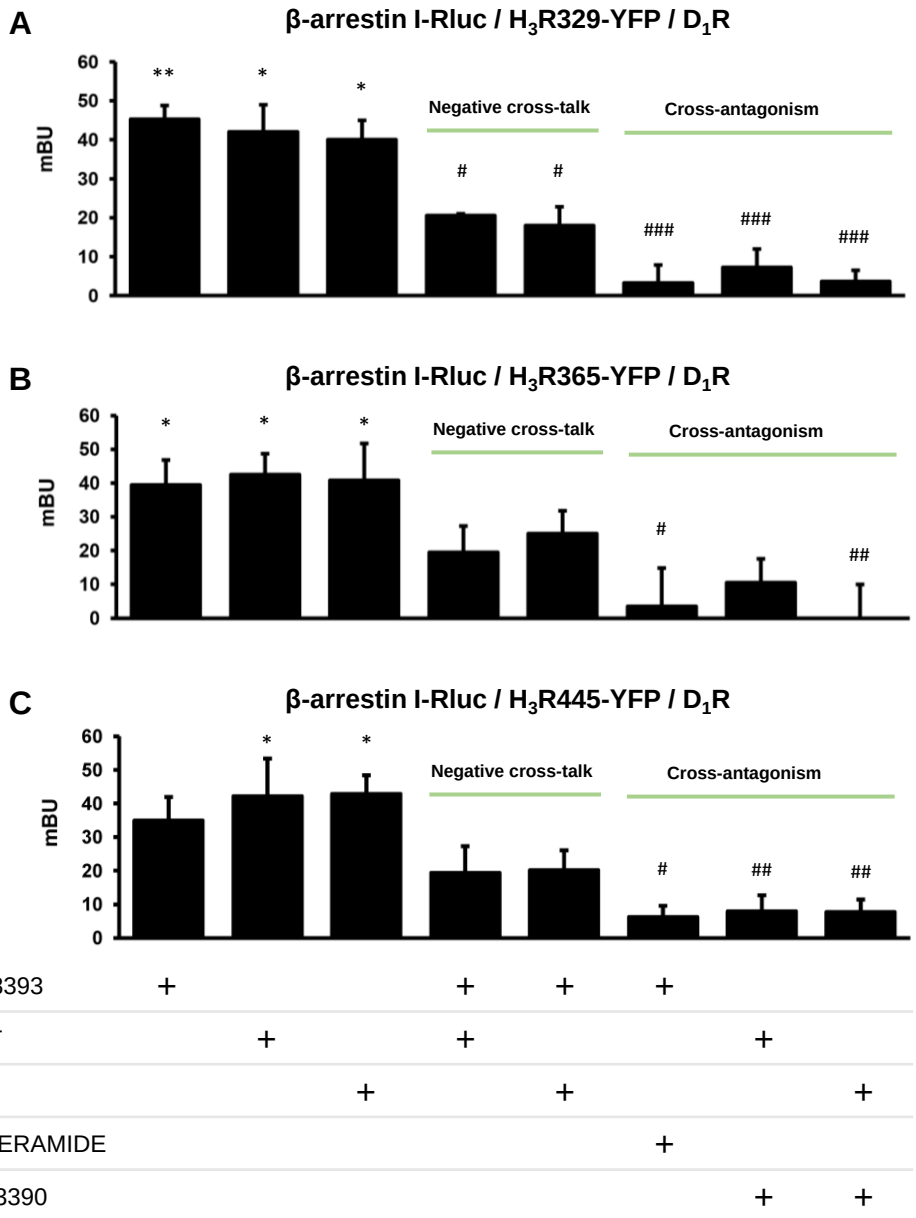


Figure 5. Loss of the histamine H_3 receptor isoform bias at β-arrestin I recruitment by heteromerization with D_1R. HEK-293T cells were transiently transfected with 1μg of β-arrestin I-Rluc together with 2μg of D_1R and 3 μg of each H_3R isoform-YFP 329 **(A)**, 365 **(B)** and 445 **(C)** and β-arrestin I recruitment was measured by BRET assays. Cells were not treated (BRET ratio<10) or treated with 10μM of thioperamide or SCH23390 before 10 minutes of 1μM treatment with SKF 38393, imetit or RAMH. Values represent mean±S.E.M. (n=4). One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed a significant effect over basal (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$) and Bonferroni post hoc test showed a significant effect comparing double treatments (antagonist plus agonist or agonist plus agonist) over the agonist single treatment ($^{\#}p < 0.05$; $^{\#\#}p < 0.01$ $^{\#\#\#}p < 0.001$) or the .

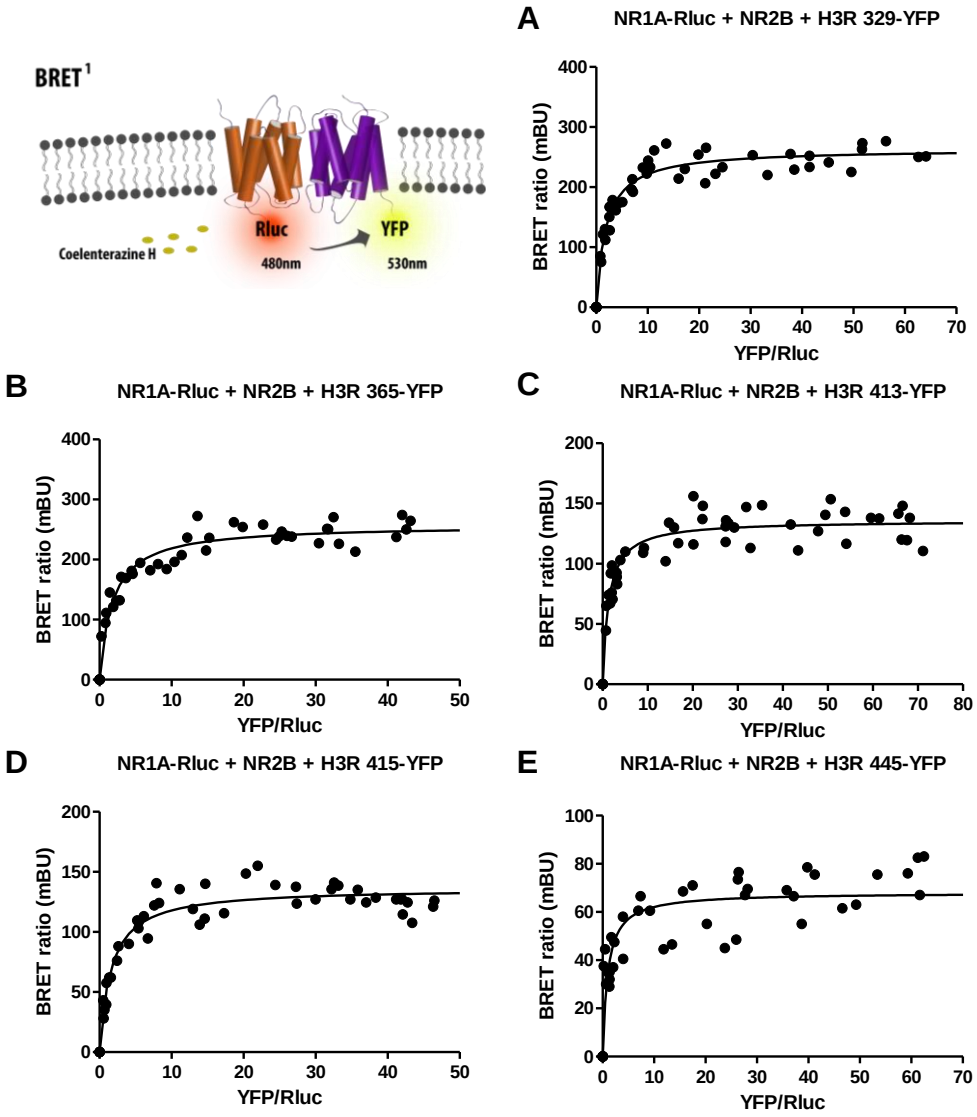


Figure 6. Glutamate NMDA receptor (NR1A/NR2B) form heteromers with histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413, 415 and 445 in HEK-293T cells. BRET[1] experiments were performed with HEK-293T cells co-expressing NR1A–Rluc, NR2B and each H_3R-isoform–YFP: H_3R329 **(A)**, H_3R365 **(B)**, H_3R413 **(C)**, H_3R415 **(D)** and H_3R445 **(E)**. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid–YFP (0.1–5 µg of each cDNA) whereas the Rluc levels have been maintained constant (0.4 µg of each cDNA). Both fluorescence and luminiscence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 100.000-150.000 luminescent units) while monitoring the increase of acceptor expression (1000–70.000 fluorescent units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc) x 1000. BRET data are expressed as means of 10 different experiments performed in duplicate. Negative controls are shown in Supplementary Figure 1.

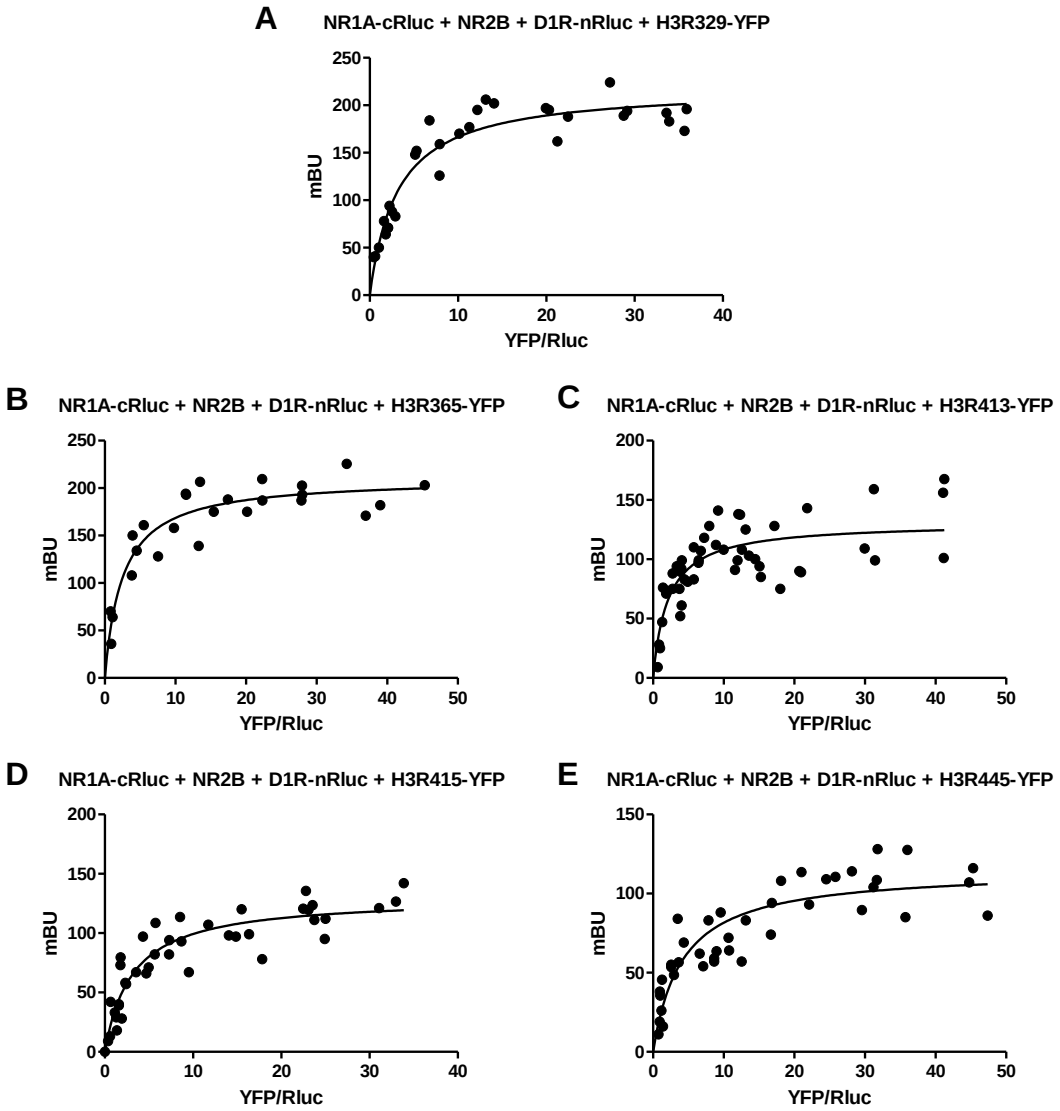
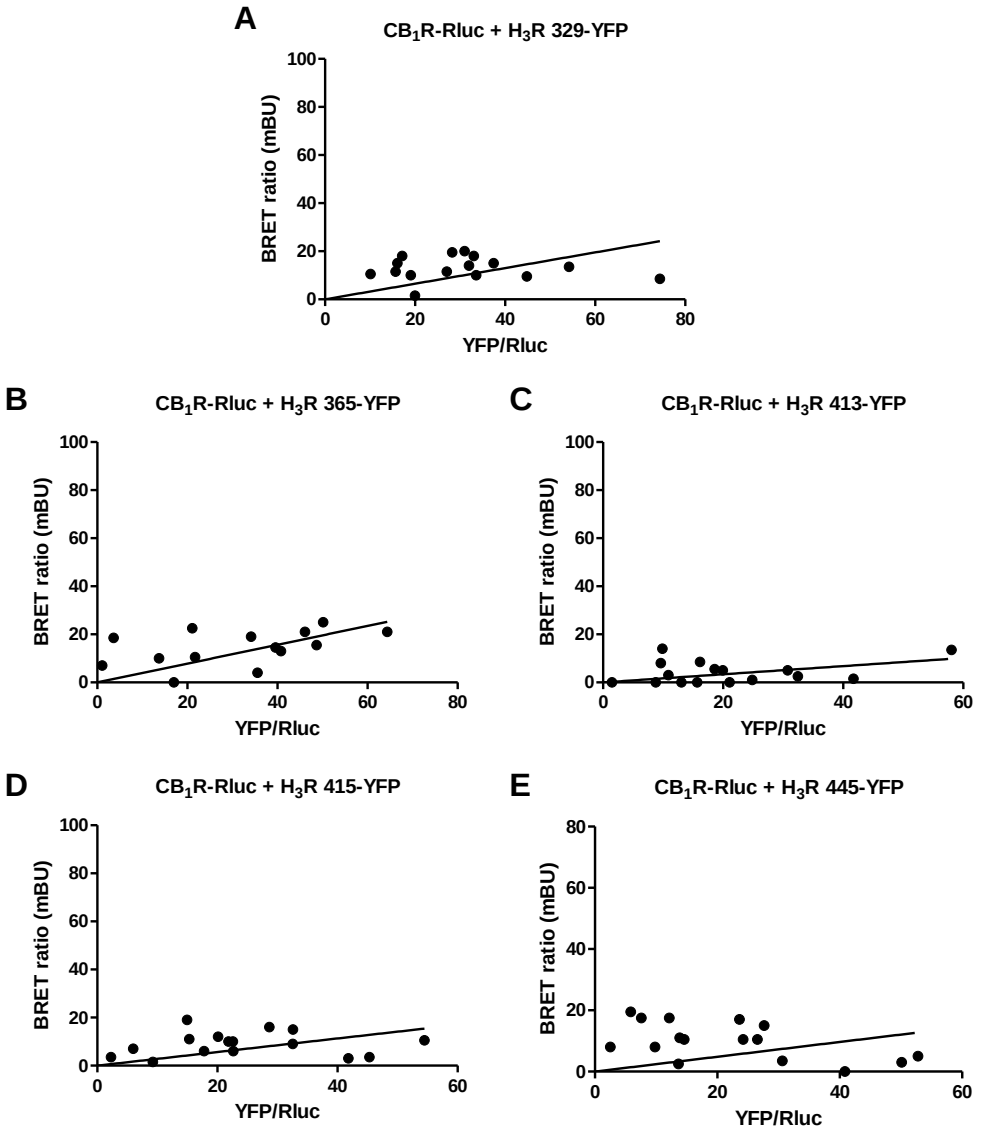


Figure 7. Glutamate NMDA receptor (NR1A/NR2B), dopamine D_1 receptor and histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413, 415 and 445 form heterotrimeric complexes in HEK-293T cells. BRET with bimolecular luminescence complementation experiments were performed with HEK-293T cells co-expressing NR1A–cRluc, NR2B, D_1R-nRluc and each H_3R-isoform–YFP: H_3R329 **(A)**, H_3R365 **(B)**, H_3R413 **(C)**, H_3R415 **(D)** and H_3R445 **(E)**. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid–YFP (0.1–5 µg of each cDNA) whereas the complemented Rluc levels have been maintained constant (0.5 µg of NR1A –cRluc , 0.5 µg of NR2B and 1 µg of D_1R-nRluc cDNA). Both fluorescence and luminiscence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 100.000 luminescent units) while monitoring the increase of acceptor expression (1000–70.000 fluorescent units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (complemented Rluc) x 1000. BRET data are expressed as means of 10 different experiments performed in duplicate. Negative controls are shown in Supplementary Figure 1.

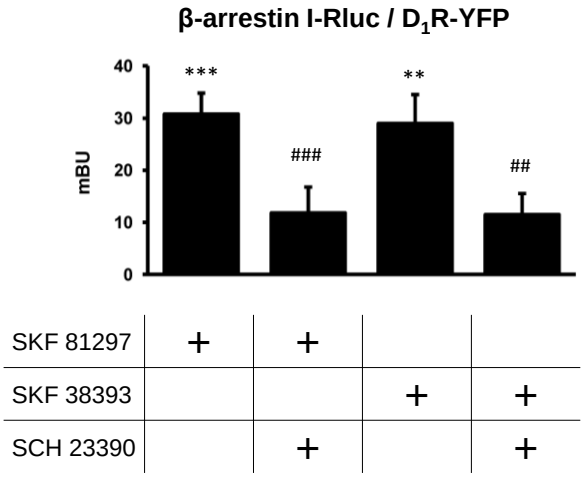
Supplementary Table 1. Correlations between fluorescence and H_3R receptor expression levels at $BRET_{50}$

	D_1R-Rluc		NR1A-Rluc + NR2B		NR1A-cRluc + NR2B + D1R-nRluc	
	Infold Fluorescence at $BRET_{50}$	pmol of H_3R (mg protein)$^{-1}$ at $BRET_{50}$	Infold Fluorescence at $BRET_{50}$	pmol of H_3R (mg protein)$^{-1}$ at $BRET_{50}$	Infold Fluorescence at $BRET_{50}$	pmol of H_3R (mg protein)$^{-1}$ at $BRET_{50}$
H_3R329-YFP	1.1	0.005	1.12	0.005	1.39	0.018
H_3R365-YFP	1.4	0.044	1.19	0.021	1.24	0.027
H_3R413-YFP	1.8	0.830	1.14	0.143	1.05	0.052
H_3R415-YFP	2.2	1.347	1.15	0.164	1.32	0.359
H_3R445-YFP	2.9	1.049	1.06	0.035	1.63	0.348

Fluorescence levels are expressed as infolds respect to basal fluorescence (no transfected cells) and receptor expression levels are represented as pmol of receptor / mg of protein. Both parameters correspond to those obtained at $BRET_{50}$



Supplementary Figure 1. Histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 413, 415 and 445 do not interact with CB_1R in HEK-293T cells. BRET[1] experiments were performed with HEK-293T cells co-expressing CB_1R–Rluc and each H_3R-isoform–YFP: H_3R329 **(A)**, H_3R365 **(B)**, H_3R413 **(C)**, H_3R415 **(D)** and H_3R445 **(E)**. Co-transfections were performed with increasing amounts of plasmid–YFP (0.1–5 µg of each cDNA) whereas Rluc levels have been maintained constant (0.5-0.8 µg). Both fluorescence and luminiscence of each sample were measured before every experiment to confirm similar donor expressions (about 100.000-150.000 luminescent units) while monitoring the increase of acceptor expression (1000–70.000 fluorescent units). The relative amount of BRET is given as the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP) and the luciferase activity of the donor (Rluc) x 1000. BRET data are expressed as means of 10 different experiments performed in duplicate.



Supplementary Figure 2. D_1R promotes β-arrestin I recruitment. HEK-293T cells were transiently transfected with 1µg of β-arrestin I-Rluc and 2 µg of D_1R-YFP and β-arrestin I recruitment was measured by BRET assays. Cells were not treated (BRET ratio<10) or treated with 10µM of SCH 23390 before 10 minutes of 1µM treatment with SKF 81297 or SKF 38393. Values represent mean±S.E.M. (n=4). One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test showed a significant effect over basal (**$p < 0.01$; ***$p < 0.001$) and Bonferroni post hoc test showed a significant effect comparing treatments of antagonist plus agonist over the agonist single treatment ($^{\#\#}p < 0.01$; $^{\#\#\#}p < 0.001$).

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los GPCRs son proteínas de membrana versátiles capaces de ser activadas por una amplia variedad de estímulos que incluyen fotones, iones, moléculas odorantes, gustantes, hormonas y neurotransmisores (Fredriksson et al., 2003; Wacker et al., 2017) y son responsables de la transducción de señales extracelulares y de la modulación de distintas vías de señalización intracelulares de manera específica. Sus funciones son extremadamente diversas y, dado que regulan múltiples procesos fisiológicos tales como funciones neurológicas, inmunológicas, cardiovasculares, endocrinas y metabólicas, son considerados importantes dianas terapéuticas. De hecho, el 34% de los fármacos comercializados en la actualidad ejercen sus efectos modulando la actividad de GPCRs, el 26% de los cuales tienen como diana el SNC (Hauser et al., 2017). Los últimos avances han demostrado que existe una mayor complejidad en la regulación y la señalización de estos receptores de la que se había revelado inicialmente, incluyendo la señalización mediante vías independientes de proteína G, la existencia de ligandos funcionalmente selectivos capaces de promover eventos de señalización específicos a través de un mismo receptor y su actualmente aceptada capacidad de oligomerización con otros receptores, no únicamente con otros GPCRs, sino también con otras familias tales como canales iónicos.

Debido a su estructura y localización, los GPCRs tienen la capacidad de interaccionar con otras proteínas, no solo por el lado extracelular e intracelular de la membrana plasmática, sino que también exhiben interacciones proteína-proteína con otros receptores o canales iónicos a nivel de membrana plasmática (Franco et al., 2003; Rojas and Dingledine, 2013). Estas interacciones pueden afectar notablemente a las propiedades del receptor, como su conformación y propiedades bioquímicas, su compartimentación celular, así como promover el ensamblaje en complejos proteicos o clústeres que integran una función (Gingell et al., 2016; Khoury et al., 2014; Melancon et al., 2012). Así, la capacidad de los GPCRs de interaccionar entre sí formando complejos homodiméricos, heterodiméricos y oligoméricos de orden superior (Bouvier, 2001; Ferré et al., 2009, 2014), da lugar a un nuevo nivel de complejidad que gobierna la señalización y regulación de estas proteínas, otorgándoles nuevas propiedades farmacológicas y/o funcionales (*fingerprint* molecular y bioquímico), por lo que los complejos de receptores son consideradas entidades funcionales distintas a los monómeros que los componen.

Los resultados descritos en esta Tesis ponen de manifiesto la importancia de la oligomerización entre receptores en procesos neuropatológicos como la adicción, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer. El estudio se ha focalizado en los sistemas dopaminérgico e histaminérgico, ambos con una función esencial moduladora sobre un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos de gran complejidad, tanto voluntarios como involuntarios. Concretamente, se ha caracterizado funcional y molecularmente la interacción entre el receptor dopaminérgico D_1R y el receptor histaminérgico H_3R y sus isoformas, así como la interacción de estos receptores con otras proteínas y su posible implicación en diversos desórdenes neurológicos.

La histamina ha mostrado su capacidad de modular la actividad locomotora, las emociones, los procesos cognitivos, el sueño y los ritmos circadianos, la percepción del dolor, la homeostasis energética y la respiración (Haas and Panula, 2003; Haas et al., 2008). Muchos de estos procesos son también regulados por la dopamina (Iversen and Iversen, 2007; Missale et al., 2010), lo que sugiere la necesidad de un equilibrio y comunicación entre ambos sistemas de neurotransmisión. Recientemente y previamente a la realización de esta Tesis, había sido demostrada la existencia de heterómeros formados por H_3R y D_1R y habían sido descritas algunas de sus características

bioquímicas tras su estudio en sistemas celulares de expresión heteróloga y en el núcleo estriado de rata (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011). Entre ellas, cabe destacar la capacidad adquirida de agonistas selectivos de $D_{1/5}R$ de activar proteína Gαi/o, la capacidad del H_3R de activar señalización por la vía de las MAPKs, así como la capacidad del H_3R de inhibir ciertas vías de señalización celulares mediadas por el D_1R, incluida la muerte celular, cuando ambos receptores se expresan postsinápticamente. A nivel de conectividad cerebral, se ha propuesto que el heterómero formado por D_1R-H_3R trabajaría como un procesador que integra señales inducidas por dos neurotransmisores distintos, la dopamina y la histamina, y capaz de procesar las distintas señales, incluso las que recibe en un mismo intervalo de tiempo. Concretamente, la señalización del H_3R serviría como control del tono de señalización inducido por el D_1R en aquellas neuronas en las que se encuentren interactuando (Ellenbroek, 2013; Moreno et al., 2011; Panula and Nuutinen, 2013).

Los receptores de dopamina están implicados, entre otros muchos procesos, en el control del sistema de recompensa y, en condiciones normales, existe un delicado equilibrio entre las señales de búsqueda de la recompensa, controladas por neuronas que expresan D_1R, y las señales de aversión, procedentes de neuronas que expresan D_2R (Gerfen and Surmeier, 2011). La cocaína es capaz de perturbar este equilibrio alterando la señalización de estas dos vías de manera que domine la promovida por los D_1Rs (Park et al., 2013; Volkow et al., 2013). Esto lo consigue en gran parte por su unión al transportador de dopamina DAT y su consecuente inhibición, incrementando los niveles de dopamina en las sinapsis, así como por su unión a σ_1R, el cual a su vez modula a los receptores de dopamina (Navarro et al., 2010, 2013). Debido a que la cocaína se une con mayor afinidad a DAT que a σ_1R, el papel de σ_1R en las propiedades adictivas de la cocaína fue inicialmente objeto de debate, aunque actualmente existe una gran cantidad de evidencias experimentales que demuestran la implicación de σ_1R en los efectos farmacológicos de la cocaína, no sólo en sus efectos agudos sino también sobre el sistema de recompensa (Katz et al., 2016; Maurice and Su, 2009; Robson et al., 2012; Sabino et al., 2017). Entre las evidencias existentes destaca el incremento del nivel de σ_1R cerebral como consecuencia de la exposición continuada a cocaína, por un proceso que implica la unión de la cocaína a σ_1R (Liu and Matsumoto, 2008). Esta regulación positiva sobre σ_1R, que no ocurre en ratones con deleción genética de D_1R (Zhang et al., 2005), parece ser uno de los mecanismos por los que la cocaína induce en modelos animales la autoadministración de agonistas de σ_1R (Hiranita et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado también la interacción directa entre σ_1R y el DAT y se ha sugerido que la unión de cocaína al σ_1R, además de provocar el aumento de su expresión en membrana, promueve la disociación de multímeros de σ_1R a monómeros, que consecuentemente podrán interactuar con el DAT y estabilizarlo en una conformación que favorece su unión a cocaína, hecho que se ha propuesto como subyacente a la potenciación conductual de la autoadministración de cocaína en modelos animales (Hong et al., 2017). Estos monómeros de σ_1R, además de interactuar con el DAT, podrán interactuar con el D_1R, lo que ha demostrado ser de gran importancia en los eventos iniciales de exposición a cocaína (Navarro et al., 2010).

Teniendo en cuenta que el D_1R ha mostrado su capacidad de heteromerizar tanto con el σ_1R como con el H_3R en el núcleo estriado, y teniendo en cuenta que muchos de los efectos de la cocaína son mediados por el D_1R en el heterómero σ_1R-D_1R, se ha investigado, en primer lugar, si D_1R y H_3R pueden formar complejos heterotriméricos con σ_1R y la posible implicación de estos complejos en los procesos de adicción a cocaína. En la publicación titulada **"*Cocaine Disrupts Histamine H_3 Receptor Modulation of Dopamine D_1 Receptor Signaling: σ_1-D_1-H_3 Receptor Complexes as Key Targets for Reducing Cocaine's Effects*"** ha sido demostrada, por primera vez, la existencia de heterómeros formados por σ_1R, D_1R y H_3R tanto en células transfectadas como en el núcleo estriado de rata y ratón y se han aportado evidencias de un mecanismo molecular por el cual la cocaína podría ejercer sus efectos, además de la ya

conocida capacidad de unión y bloqueo del transportador de dopamina DAT. Este nuevo mecanismo consiste en el bloqueo, por parte de la cocaína, de la inhibición que el H_3R ejerce sobre el D_1R como consecuencia de su heteromerización. Se ha demostrado que este bloqueo requiere la expresión de σ_1R, lo que reafirma trabajos previos en que la cocaína mostró ser capaz de unirse a σ_1R de forma específica (Lever et al., 2016; Navarro et al., 2010), y que se produce tras la unión de la cocaína a este receptor en el heterómero σ_1R-D_1R-H_3R. Así, esta alteración causada por la cocaína deja a un D_1R desinhibido capaz de activar proteína Gαs, reclutar β-arrestinas, incrementar los niveles de fosforilación de quinasas ERK1/2 e incluso inducir muerte celular cuando es sobreactivado. En condiciones normales, los efectos causados por D_1Rs desinhibidos o sobreactivados son compensados por señales provenientes de neuronas que expresan D_2R, pero se ha demostrado que en presencia de cocaína este equilibrio se ve alterado en favor de una señalización vía D_1R (Navarro et al., 2013; Park et al., 2013).

En este trabajo se ha demostrado que la interacción molecular de σ_1R con el heterómero D_1R-H_3R se produce por interacción directa con el D_1R pero no con el H_3R y que el bloqueo de σ_1R con un antagonista restaura el freno protector que el H_3R ejerce sobre la señalización del D_1R, incluida la prevención de la muerte celular provocada por la sobreactivación del D_1R. El hecho que un antagonista sea capaz de bloquear o afectar a la señalización de otros receptores distintos a los que se une selectivamente (antagonismo cruzado) es difícil de explicar mediante un mecanismo que no implique la heteromerización de receptores, considerando que un antagonista no induce señalización intracelular, por lo que representa un método indirecto de identificación de la heteromerización de receptores útil para su detección en tejido nativo (Ferré et al., 2009). Esta *fingerprint* molecular, junto con la técnica de PLA, ha permitido la identificación de heterómeros σ_1R-D_1R-H_3R en el núcleo estriado de rata y ratones.

El conjunto de resultados englobados en este artículo sugieren que una terapia combinada que incluya antagonistas de σ_1R, que han demostrado su capacidad de mitigar algunos efectos celulares y conductuales de la cocaína como la hiperactividad y la neurotoxicidad (Matsumoto et al., 2004; Yasui and Su, 2016), junto con ligandos de H_3R, podría ser efectiva contra algunos efectos causados por el consumo de cocaína. Aunque a nivel experimental el D_1R parece estar claramente implicado en los efectos farmacológicos de la cocaína (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Kuhar, 2016; Navarro et al., 2010), se han obtenido resultados conflictivos a nivel clínico por el uso de antagonistas de D_1R (Nann-Vernotica et al., 2001), seguramente debido a la dificultad de alcanzar dosis cerebrales terapéuticas sin efectos secundarios. El tratamiento con antagonistas de σ_1R puede impedir la capacidad de la cocaína de modular a los heterómeros D_1R-H_3R, aportando un mecanismo para evitar los efectos secundarios asociados a una sobredosis de fármacos antagonistas de D_1R, que junto a fármacos dirigidos al H_3R podrían constituir potencialmente una buena estrategia terapéutica con el fin de reducir los efectos farmacológicos asociados al consumo de cocaína.

La sobreactivación de D_1Rs también se ha relacionado con la progresión de la HD, un desorden neurodegenerativo caracterizado por la aparición de corea progresiva, deterioro cognitivo y perturbaciones emocionales (André et al., 2010; Paoletti et al., 2008; Tang et al., 2007). Se ha descrito que el exceso de señalización a través del D_1R acaba provocando un desequilibrio en la transmisión dopaminérgica y finalmente muerte celular, viéndose inicialmente afectadas las MSN que expresan D_2R y produciéndose finalmente una degeneración estriatal generalizada. Concretamente, el curso de la enfermedad hace que los signos de la patología progresen hacia el caudado rostral y el putamen ventral en primera instancia, y que en pacientes con patología avanzada se observe una expansión de los ventrículos laterales y una dramática degeneración de neuronas en las regiones adyacentes al estriado y en la corteza cerebral, incluyendo regiones frontales, parietales y temporales (Bates et al., 2015; Dayalu and Albin, 2015; Raymond et al., 2011).

Basándonos en la capacidad del H_3R de modular negativamente la señalización del D_1R, se ha investigado si el heterómero D_1R-H_3R puede ser una diana terapéutica para prevenir daños asociados a esta enfermedad. En el manuscrito en vías de publicación titulado **"*Modulation of Dopamine D_1 receptors via Histamine H_3 receptors represent a novel therapeutic target for Huntington's disease*"**, se constata que la modulación de los heterómeros D_1R-H_3R es una nueva estrategia terapéutica potencial para reducir la muerte celular y prevenir la disfunción cognitiva en la HD. En primer lugar, se han identificado heterómeros D_1R-H_3R en un modelo celular de la enfermedad ($STHdh^{Q111}$) y en el estriado, la corteza y el hipocampo, regiones conocidas por verse afectadas por la toxicidad de la mhtt (Reiner et al., 1988; Rosas et al., 2003; Vonsattel and DiFiglia, 1998) de ratones *wildtype* ($Hdh^{Q7/Q7}$) y de ratones modelo de la enfermedad ($Hdh^{Q7/Q111}$), en etapas iniciales pero no en etapas tardías. Concretamente, al analizar su expresión en distintas etapas de la enfermedad, se ha observado que a los 8 meses de edad estos ratones modelo han perdido la capacidad de heteromerización entre D_1R y H_3R, correlacionando con la progresión de la enfermedad, pero esto no se debe a una disminución del nivel de expresión de los receptores.

En este trabajo se ha reportado también la capacidad de un antagonista de H_3R, la tioperamida, vía heterómeros D_1R-H_3R y mediante el fenómeno de antagonismo cruzado, de mitigar tanto la muerte celular inducida por la sobreactivación de D_1R como las vías de señalización responsables de esta muerte, las cuales implican movilización de Ca^{2+}, fosforilación de la MAPK p38 e internalización de D_1R, en células y en ratones modelo en etapas iniciales de la enfermedad (4 meses de vida). A nivel neuronal, se ha comprobado que el tratamiento de los ratones a los 6 meses de edad con tioperamida revierte la disminución del número de puntos positivos para espinofilina que se produce por pérdida de densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales CA1 del hipocampo y en neuronas de las capas I, II y III de la corteza motora. En el estriado, este tratamiento revierte ligeramente la expresión alterada de proteínas como los A_{2A}Rs y el p75NTR y las proteínas PDE10A y BDNF, mientras que no ejerce ningún efecto sobre la eliminación de cúmulos de mhtt. El análisis de los efectos de este tratamiento sobre el comportamiento de los ratones ha permitido demostrar que la tioperamida previene los déficits cognitivos y de aprendizaje motor a largo plazo, así como la pérdida de expresión del heterómero D_1R-H_3R. En correlación con los resultados obtenidos en el modelo animal de la enfermedad, se han detectado complejos D_1R-H_3R en muestras de cerebros humanos *post-mortem* de pacientes con baja progresión de la HD (Grados 0, 1 y 2), pero no en muestras de pacientes con enfermedad avanzada (Grados 3 y 4).

Por otro lado, en este trabajo también se ha querido analizar cuál es el fragmento transmembrana de interacción entre el D_1R y H_3R, con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la regulación ejercida por el H_3R sobre el D_1R. Para ello, se han probado distintos péptidos sintéticos con una secuencia homóloga a varios segmentos transmembrana del D_1R y se ha comprobado su efecto sobre el *fingerprint* bioquímico del heterómero. Concretamente, el péptido transmembrana 5, pero no el 7, es capaz de impedir tanto la heteromerización de D_1R y H_3R como los efectos neuroprotectores de la tioperamida a nivel de señalización y muerte en células. Los mecanismos de acción y regulación de los heterómeros D_1R-H_3R pueden ser múltiples y se ha comprobado que incluye las modulaciones alostéricas, ya que la eficacia ejercida por los péptidos transmembrana disruptivos pone de manifiesto la existencia de efectos originados por interacciones proteína-proteína. Otro posible y potente mecanismo de regulación adicional es que la heteromerización afecte al tráfico intracelular del D_1R, hecho que tendría consecuencias pleiotrópicas en la señalización. Los efectos en la señalización observados en este trabajo parecen producirse en una variada escala temporal y de concentraciones, en concordancia con estudios previos que muestran que la señalización de los GPCRs se produce con cinéticas variables (Calebiro et al., 2010a, 2010b).

Parte de la preocupación en las terapias dirigidas a heterómeros de GPCRs consisten en la incerteza acerca de su estabilidad y consecuentemente en si será posible afectar a la señalización de los receptores en cuestión en una adecuada escala temporal. En el caso de los heterómeros D_1R-H_3R, al parecer son lo suficientemente estables como para actuar sobre la señalización rápida, como es la movilización de Ca^{2+}, y sobre vías de señalización celular más duraderas, como la activación de p38, dos eventos que se han visto implicados en la muerte neuronal en la HD (Dau et al., 2014; Fan et al., 2012; Taylor et al., 2013; Wang et al., 2013).

Estos resultados no descartan la posibilidad de que los efectos de los ligandos de H_3R se produzcan también actuando sobre heterómeros D_2R-H_3R (Ferrada et al., 2008) y que el bloqueo de la señalización del D_2R contribuya a la protección frente a la muerte celular. Sin embargo, existen múltiples evidencias a favor de que el heterómero D_1R-H_3R sería el único responsable de los efectos ejercidos por la thioperamida en la reducción de la muerte celular. En primer lugar, la sobreactivación del D_1R activa vías de señalización implicadas en la muerte celular e induce la internalización del D_1R y la disrupción del heterómero D_1R-H_3R. Además, el pretratamiento con ligandos de H_3R impiden la muerte celular inducida por D_1R y previene la pérdida del heterómero D_1R-H_3R. Por último, el efecto ejercido por péptidos transmembrana análogos a regiones del D_1R sobre la estabilidad y función del heterómero D_1R-H_3R demuestra que se trata de una señalización y función específicas del heterómero D_1R-H_3R y no del D_2R-H_3R.

Además de la muerte neuronal en estriado, hipocampo y corteza cerebral, hay evidencias crecientes que apuntan a que la disfunción neuronal es la responsable de las alteraciones cognitivas y comportamentales que se dan en etapas iniciales de la HD (Lemiere et al., 2004; Puigdellívol et al., 2016). Actualmente no existen tratamientos efectivos para tratar el declive cognitivo, pero se cree que el momento de intervención resulta crítico, ya que la atrofia y la disfunción progresan con la edad y el tratamiento puede requerir variaciones dependiendo de la etapa de la enfermedad. Dado el importante papel que ejercen tanto la dopamina como la histamina en la plasticidad sináptica y la memoria (Cahill et al., 2014; Ellender et al., 2011; Haas et al., 2008; Komater et al., 2005; Mohsen et al., 2014; Pascoli et al., 2009; Wieschollek and Manahan-Vaughan, 2014), es posible que el potencial terapéutico de los ligandos de H_3R pueda ser extendido para la mejora de problemas cognitivos y de aprendizaje, hecho respaldado por los resultados obtenidos en este trabajo tras el tratamiento crónico de los ratones modelo de HD de 5 meses de edad con tioperamida, que muestran la prevención de los déficits en el aprendizaje motor y en la memoria espacial y de reconocimiento. Además, el tratamiento con tioperamida no ha mostrado tener efectos colaterales tales como alteraciones motoras o comportamientos asociados a ansiedad, ni en ratones *wildtype* ni en los modelo de la enfermedad.

Aunque parece improbable que exista una relación entre heterómeros D_1R-H_3R y los resultados preventivos obtenidos sobre los déficits cognitivos al tratar con tioperamida, independientemente de los cambios neuronales que se produzcan, es muy probable que los heterómeros sean necesarios, ya que, al tratar los animales a los 7 meses de edad cuando la expresión del heterómero D_1R-H_3R se ha perdido, no es posible prevenir los déficits cognitivos ni de aprendizaje motor. Aunque se desconocen en gran medida los cambios neuronales que subyacen a la acción protectora de la tioperamida, se ha dilucidado que ejerce una modulación de la plasticidad sináptica, especialmente en las espinas dendríticas de la corteza y el hipocampo, para la cual resultan de gran importancia los receptores de dopamina (Levy and Goldman-Rakic, 2000; Robbins, 2000; Sajikumar and Frey, 2004), y alteraciones en el equilibrio dopaminérgico afectan al rendimiento cognitivo (Mattay et al., 2003; Vijayraghavan et al., 2007). Dado que en etapas iniciales de la enfermedad existe una hiperdopaminergia, aquellos tratamientos capaces de reducir la señalización por dopamina han mostrado tener beneficios terapéuticos, como ocurre con la tetrabenazina, que ha mostrado un efecto neuroprotector (Wang et al., 2010) pero no una capacidad de mejora cognitiva.

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados englobados en este trabajo, se ha sugerido que los heterómeros D_1R-H_3R juegan un papel crucial en el control de la señalización dopaminérgica y que representan nuevas dianas para tratar la HD. El tratamiento con antagonistas de H_3R, actuando en etapas iniciales de la enfermedad en que no se haya producido la pérdida de expresión del heterómero D_1R-H_3R, permitiría enlentecer su progresión previniendo no sólo la aparición de los síntomas motores, sino también el declive cognitivo y los síntomas psiquiátricos.

Dada la robusta evidencia experimental para los mecanismos patogénicos de la mhtt, es muy posible que sus efectos tóxicos pleiotrópicos sean los responsables de la neurodegeneración. Muchos de los mecanismos patogénicos de la mhtt descritos son comunes en otras enfermedades neurodegenerativas, como la PD y la AD, aunque en el caso de la HD se conoce el punto de partida, que es la mutación de un único gen. Así, el estudio de la patogénesis en la HD podría ayudar no únicamente a los pacientes que la padecen sino también a aquellos que presenten otros tipos de neurodegeneración (Dayalu and Albin, 2015). De hecho, en la AD se ha descrito también la existencia de neurotoxicidad, en este caso por un exceso de glutamato, el neurotransmisor excitatorio mayoritario en el SNC. Pese a su naturaleza ubicua, el nivel extracelular de glutamato está altamente regulado, hecho que permite sus funciones como mediador de la plasticidad neuronal, incluyendo tanto la potenciación a largo plazo como la eliminación celular (Niciu et al., 2012; Zhou and Danbolt, 2014). Bajo ciertas circunstancias patológicas, elevados niveles de glutamato, al igual que ocurre con la dopamina, pueden provocar muerte celular por excitotoxicidad y ésta se ha asociado con la disfunción neuronal y neurodegeneración presentes en la AD, concretamente por la sobreactivación crónica de receptores glutamatérgicos NMDAR (Ferreira et al., 2015; Hu et al., 2012; Lau and Tymianski, 2010; Lin et al., 2014; Parsons and Raymond, 2014; Talantova et al., 2013; Zhang et al., 2016). Se trata de canales de Ca^{2+} regulados por ligando y dependientes de voltaje, que en ser activados en exceso provocan una entrada y señalización excesiva de este ion y una consecuente inducción de hiperexcitabilidad en la neurona postsináptica, hasta el punto de causar excitotoxicidad y muerte celular.

Considerando que el NMDAR puede heteromerizar con el D_1R (Lee et al., 2002), que ambos han mostrado capacidad para regularse mutuamente (Cahill et al., 2014; Lee et al., 2011, 2002; Nai et al., 2010; Pei et al., 2004; Wang et al., 2012) y que el H_3R es capaz de modular a su vez la señalización del D_1R, se ha investigado si los D_1R y los H_3R pueden formar complejos heterotriméricos con el NMDAR y si el H_3R es capaz de modular al NMDAR y/o al D_1R en estos complejos, con la finalidad de encontrar una aproximación farmacológica capaz de disminuir la excitotoxicidad causante de muerte celular en la corteza cerebral. En la publicación **"*Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D_1, Histamine H_3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease*"** se ha demostrado la existencia de heterómeros formados por D_1R, H_3R y NMDAR en muestras de corteza de rata y de ratones modelo de AD (ratones APP/PS1), y se ha analizado su potencial como diana terapéutica para reducir la muerte celular por excitotoxicidad en esta enfermedad. En primer lugar, se han detectado complejos proteicos formados por estos receptores en sistemas celulares de expresión heteróloga mediante técnicas de BRET. Al analizar la interacción entre H_3R y NMDAR, se ha descubierto que ésta se produciría únicamente cuando es coexpresada la subunidad NR2B del receptor de NMDA, pero no cuando únicamente se expresa la subunidad NR1. En cambio, en consonancia con publicaciones previas (Lee et al., 2002, 2002; Pei et al., 2004), el D_1R interacciona con el NMDAR tanto por la subunidad NR1 como por la NR2B. También se ha detectado la posible formación de complejos constituidos por los tres receptores mediante BRET con complementación fluorescente bimolecular. Los cambios en BRETmax inducidos tras la activación con dopamina en los sistemas en que los tres

receptores están coexpresados, refleja las interacciones alostéricas esperadas cuando un receptor en el complejo es activado.

En muestras de corteza de rata, se ha comprobado la expresión del heterómero D_1R-H_3R por PLA y la conservación de sus interacciones funcionales descritas previamente en estriado (Moreno et al., 2011). Concretamente, se ha observado que agonistas de H_3R, mediante una comunicación cruzada (*cross-talk)* negativa, y antagonistas de H_3R, mediante un antagonismo cruzado (*cross*-antagonismo), no sólo disminuyen la señalización inducida por agonistas de D_1R, determinada por la fosforilación de ERK1/2 o Akt, sino que también previenen la muerte celular por excitotoxicidad mediada por la sobreactivación de D_1R en cultivos corticales organotípicos. Previamente había sido reportado que la toxicidad neuronal por dopamina está mediada por los receptores dopaminérgicos y por su metabolismo intracelular, el cual lleva al incremento de las ratios $NAD(P)^+$/NAD(P)H (Chen et al., 2004, 2009; Giménez-Xavier et al., 2006; Wersinger et al., 2004). Según describieron Sidharthan y colaboradores, la dopamina induce un aumento de los niveles de la sulfotransferasa SULT1A1/3, una enzima que degrada rápidamente la dopamina protegiendo a la célula de su toxicidad, y reportaron que esta inducción requería de la activación de NMDARs, sugiriendo una interacción entre D_1R y NMDAR con función protectora (Sidharthan et al., 2013). También en muestras corticales de rata, primero se comprobó que el NMDA, aplicado a dosis elevadas (50μM), provoca una muerte celular en este tejido. Sorprendentemente, el tratamiento previo con antagonistas de D_1R o de H_3R es capaz de evitar la muerte celular inducida por el NMDA, evidenciando una interacción funcional compleja entre los NMDAR y los heterómeros D_1R-H_3R. Se ha sugerido que, probablemente debido a la heteromerización, los H_3R actuarían como moduladores alostéricos de D_1R y NMDAR.

Al analizar la expresión endógena del heterotrímero D_1R-H_3R-NMDAR en los ratones, mediante ensayos de PLA combinando parejas de los tres receptores, no se observan diferencias en los niveles de expresión entre los ratones *wild type* y los APP/PS1. También en estos ratones se ha analizado la interacción entre los receptores del complejo a nivel de muerte celular en cultivos corticales organotípicos y se ha detectado la capacidad del antagonista de H_3R tioperamida de prevenir la muerte inducida por dosis elevadas (50μM) de NMDA o SKF 81297 (agonista de $D_{1/5}R$). Sorprendentemente, también el antagonista de NMDAR MK-801 y el antagonista de D_1R SCH-23390 son capaces de prevenir la muerte provocada por el SKF 81297 y por NMDA, respectivamente. Aunque no resultó estadísticamente significativo, se observa una tendencia de la tioperamida, aplicada sola, de disminuir el nivel de muerte basal en la corteza de ratones APP/PS1. Por último, debido a la reportada implicación de la proteína β-amiloide en el incremento de la vulnerabilidad por excitotoxicidad y a evidencias de una posible unión de esta proteína a los NMDARs (Koh et al., 1990; Le et al., 1995; Wu et al., 1995), se han tratado muestras de corteza con péptido $\beta_{1\text{-}42}$-amiloide y se ha evaluado su toxicidad cuantificando el nivel de muerte celular, la cual también puede ser prevenida con el tratamiento previo con tioperamida.

Estos resultados ponen en evidencia la interacción entre estos tres receptores y sugieren que los H_3Rs, en los complejos D_1R-H_3R-NMDAR, son dianas prometedoras para prevenir la neurodegeneración mediante el tratamiento con antagonistas de H_3R que presenten capacidad neuroprotectora. Otros trabajos también sugieren la modulación vía H_3R del tono colinérgico en corteza e hipocampo y proponen el uso de la tioperamida como una intervención terapéutica para aumentar la señalización colinérgica en AD (Passani and Blandina, 1998). Resultados recientes obtenidos de ensayos clínicos en fase II con pacientes con leve y moderada AD muestran que la monoterapia con GSK239512, un antagonista selectivo de H_3R seguro y capaz de penetrar la BBB, mejora la memoria episódica aunque no la memoria de trabajo o las funciones ejecutivas (Grove et al., 2014). Aunque las mejoras de la función cognitiva en estos pacientes no son satisfactorias, no se debe subestimar el potencial de los antagonistas de H_3R

para frenar o prevenir la progresión de la enfermedad, ya que los resultados *in vitro* apuntan a que son eficientes previniendo la excitotoxicidad por Aβ, por lo que sería oportuno analizar clínicamente su potencial como neuroprotectores.

El conjunto de resultados anteriormente expuestos pone de manifiesto que los heterómeros D_1R-H_3R son una diana prometedora para el tratamiento de diversos trastornos neurológicos y muestran un potencial terapéutico neuroprotector de los antagonistas del H_3R. Aunque se conocen muchas de las interacciones funcionales entre D_1R y H_3R y se ha comprobado que están implicadas interacciones alostéricas (mediante el uso de péptidos TM disruptivos o mediante cambios en la transferencia de energía por BRET tras la activación del D_1R), estas no han sido estudiadas a nivel molecular. Tras la oligomerización de GPCRs, se produce un alosterismo lateral entre receptores que puede originarse tanto por el efecto de la activación de un protómero sobre el otro protómero, como por la mera interacción con otro protómero igual (homodímero) o diferente (heterodímero) (Ferré et al., 2016; Smith and Milligan, 2010), cuyas consecuencias pueden manifestarse como una modulación positiva, negativa o neutra de la función del receptor (Kenakin, 2009; Melancon et al., 2012). De hecho, los receptores modulados alostéricamente pueden ser considerados como nuevas entidades con una nueva actividad potencial.

Con el propósito de conocer con mayor profundidad las interacciones alostéricas entre D_1R y H_3R a nivel molecular y de encontrar ligandos del H_3R que modulen la funcionalidad del D_1R, se ha analizado molecular y funcionalmente un amplio número de ligandos de H_3R y se ha investigado el perfil de activación de proteínas Gαs y Gαi de ambos receptores, tanto en su forma homodimérica como heterodimérica. En el manuscrito en vías de publicación **"*Allosteric and functional modulation of dopamine D_1 receptors by targeting histamine H_3 receptors in D_1-H_3 heteroreceptor complexes*"** se han aportado más evidencias de la heteromerización entre D_1R y H_3R, así como de la existencia de modulaciones alostéricas entre éstos, con posibles consecuencias funcionales importantes. Dado que el CODA-RET es una técnica que requiere necesariamente la dimerización de dos receptores para que se produzca la complementación de la señal bioluminiscente, tenemos un control elevado de las especies de receptor que participan en la transferencia de energía (Urizar et al., 2011). Esto significa que al analizar un heterodímero mediante esta técnica, los resultados obtenidos no se ven contaminados por la señalización de complejos homodiméricos ni por cruzamientos en la señalización que se den en niveles inferiores de la cascada, ya que no contribuyen a la transferencia de energía. Además, es importante destacar que los altos valores de BRETratio sin procesar observados en los ensayos de CODA-RET cuando no se ha aplicado ligando, producidos como consecuencia de una transferencia de energía, indican que la proteína G ya se encuentra unida a los receptores previamente a su activación y, consecuentemente, los incrementos observados en la señal de BRET cuando se aplican agonistas y se procesan los valores responden a una reorganización espacial de la proteína G heterotrimérica activada. Esta observación concuerda con la previamente demostrada existencia de complejos receptor - proteína G - AC preensamblados, en los que tras la unión de un agonista el receptor sufre un cambio conformacional que provoca la reorganización de las subunidades Gα, Gβ y Gγ de la proteína G, resultando en la apertura de la interfaz entre Gβ y Gγ pero sin su disociación del complejo (Galés et al., 2006; Navarro et al., 2018).

Hasta la fecha, había sido propuesto que el heterómero D_1R-H_3R podía activar proteína Gαi tras el tratamiento con agonistas de $D_{1/5}R$ (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011, 2014), hecho que ha sido confirmado en este trabajo mediante la técnica de CODA-RET, aunque a concentraciones de agonistas de $D_{1/5}R$ más elevadas que para la activación de Gαs. Los resultados obtenidos por CODA-RET sugieren que este fenómeno probablemente se produce por un mecanismo de transactivación inducido por interacciones alostéricas entre protómeros,

debido a que cada receptor en el heterómero D_1R-H_3R mantiene su señalización canónica de proteínas G (aunque con diferencias en la potencia y eficacia comparado con los complejos homoméricos debido también a interacciones alostéricas), y a que los agonistas de $D_{1/5}R$ no pueden activar proteína Gαi al unirse a homómeros D_1R-D_1R ni H_3R-H_3R. Además, mediante BRET por complementación bimolecular fluorescente y bioluminiscente, se ha comprobado que el heterómero D_1R-H_3R puede presentar una estructura tetramérica constituida por dos homodímeros de cada receptor, lo que sugiere la posibilidad de que tanto Gαs como la Gαi se encuentren unidas al heterotetrámero, probablemente una bajo cada homodímero de receptores, ya que ésta ha sido la estequiometría receptor-proteína G propuesta para otros GPCRs de acuerdo a estudios de modelaje estructural (Navarro et al., 2016, 2018). La posibilidad de una estructura heterotetramérica junto con los resultados obtenidos por CODA-RET apoyan esta hipótesis pero, sin embargo, también sería posible que el homodímero de D_1R, en el complejo heterotetramérico D_1R-H_3R, pudiera unirse no sólo a proteína Gαs sino también a Gαi como consecuencia de su interacción con H_3R, por lo que es necesaria la realización de un modelaje molecular para dilucidar cual es la distribución más probable.

Además de los cambios alostéricos inducidos como consecuencia de las interacciones directas receptor-receptor, la activación de un receptor ha mostrado ser capaz de causar cambios funcionales y de afinidad importantes en el heterorreceptor asociado. Tal y como muestran los resultados obtenidos en experimentos de unión a radioligando, farmacológicamente se observa una mejora de la unión de la dopamina al D_1R cuando el H_3R es coactivado, aunque esta modulación alostérica positiva ejercida por los ligandos de H_3R afecta principalmente a la unión de la dopamina al segundo protómero en el dímero D_1R-D_1R del heterotetrámero D_1R-D_1R-H_3R-H_3R, ya que en las curvas de desplazamiento fundamentalmente se ha visto afectada la K_{DB2}. Por el contrario, los cambios en las potencias de activación observados en los ensayos de CODA-RET indican que, funcionalmente, la coactivación del heterómero D_1R-H_3R lleva a un debilitamiento de la señalización inducida por D_1R y a un favorecimiento de la del H_3R. Según estos resultados, las modulaciones alostéricas ejercidas sobre el D_1R e inducidas por ligandos selectivos de H_3R actuando sobre el H_3R, causan, por un lado, importantes modificaciones en el sitio ortostérico del D_1R que conllevan una mejora de la unión de la dopamina al segundo protómero del dímero D_1R-D_1R y únicamente cuando una molécula de dopamina ya se encuentra unida al primer protómero, y, por otro lado, cambios conformacionales en la región citoplasmática del D_1R que empeoran su potencia para activar proteína Gαs. Aunque la modulación alostérica observada a nivel de unión de la dopamina resulta positiva por un aumento de afinidad, el resultado fisiológico de la activación del segundo protómero del homodímero D_1R-D_1R probablemente resulta en una inhibición de la señalización, de acuerdo a resultados obtenidos previamente para el homodímero D_2R-D_2R (Han et al., 2009). Han y colaboradores demostraron que, mientras que la unión de agonistas inversos al segundo protómero aumenta la señalización, la unión de agonistas la inhibe, y proponen que la funcionalidad de los dímeros de GPCRs puede ser modulada fisiológicamente por el estado de activación del segundo protómero, lo que representa además una nueva estrategia terapéutica a considerar. En conjunto, los resultados específicos de heterómero obtenidos mediante ensayos de CODA-RET y de unión a radioligando reflejan la existencia de interacciones alostéricas entre D_1R y H_3R que podrían explicar, al menos en parte, los efectos observados *in vivo* cuando ambos receptores son activados, como la capacidad de ligandos de $D_{1/5}R$ de disminuir el nivel de cAMP celular y la capacidad de ligandos selectivos de H_3R de modular la señalización del D_1R (Ellenbroek, 2013b; Moreno et al., 2011, 2014; Rapanelli, 2017; Rodríguez-Ruiz et al., 2016; Sánchez-Lemus and Arias-Montaño, 2004).

Aunque estudios previos han reportado la capacidad del D_1R de activar movilizaciones de Ca^{2+} intracelular de una forma independiente de cAMP, en este trabajo se ha confirmado que este

fenómeno no se produciría por la activación de proteína Gαq. De hecho, estudios recientes sugieren al D_5R como principal mediador *in vivo* de la señalización a través de proteína Gαq y sugieren que el D_1R probablemente necesita de la interacción con otras proteínas/receptores para ser capaz de activar proteínas Gαq (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Beaulieu et al., 2015). Con respecto a la inhibición de la señalización por Ca^{2+} inducida por H_3R, se sabe que se produce a través de la inhibición de canales tipo N y tipo P/Q por parte de subunidades Gβγ (Ikeda and Dunlap, 1999; Smrcka, 2008; Takeshita et al., 1998) y que es la responsable de la inhibición presináptica ejercida por el H_3R, por lo que en este caso no esperábamos observar activación de proteína Gαq por parte de este receptor, pero tampoco se ha observado una inhibición. Además, también es posible que la interacción directa del D_1R y del H_3R con canales de Ca^{2+}, como el NMDAR (Lee et al., 2002; Pei et al., 2004; Rodríguez-Ruiz et al., 2016), pueda estar mediando parte de sus respuestas sobre la movilización de Ca^{2+} *in vivo* en aquellas neuronas en las que estos receptores se encuentren coexpresados.

La complejidad de la señalización de los GPCRs abre la posibilidad de que los distintos subtipos de proteína Gαi/o (Gαo1, Gαo2, Gαi1, Gαi2 and Gαi3) tengan distintas afinidades para el H_3R y para este receptor cuando adopta distintas conformaciones como consecuencia de la unión de distintos ligandos o bien por su interacción con otras proteínas, como el D_1R. Mediante ensayos de BRET por activación de proteína G, en este trabajo se han aportado evidencias de la capacidad del H_3R de activar todos los subtipos de proteína Gαi/o y se han descrito los perfiles de potencias de activación tanto de la histamina como de agonistas sintéticos selectivos de H_3R. El hecho de que los distintos subtipos de proteína Gαi/o muestren una distribución diferencial a nivel tisular y celular (Wettschureck and Offermanns, 2005) y de que los distintos KO generados para cada subtipo de Gαi/o muestren deficiencias únicas (Jiang et al., 2001), respaldan la idea de que cada subtipo de Gαi/o tendría una función biológica diferenciada y que no se trata de simples isoformas. La capacidad del H_3R de activar todos los subtipos de Gαi/o confiere a este receptor la posibilidad de inducir señalización por proteína G en todas aquellas neuronas en las que se expresen y las diferencias observadas en la potencia de la histamina (con una mayor potencia para Gαo1 y una menor para Gαi2 y Gαi3) posiblemente podrían resultar determinantes *in vivo*. Con respecto al D_1R, mediante esta técnica se ha detectado una activación selectiva de subtipos de proteína Gαi/o, ya que únicamente se ha detectado su capacidad de activar Gαo2 y Gαi1 (la misma subunidad con la que ha mostrado activación por CODA-RET), mientras que en ningún caso se ha detectado su capacidad para activar Gαo1, Gαi2 o Gαi3. Por otro lado, el perfil diferencial de potencias exhibido por el H_3R y la activación diferencial entre subtipos de Gαi/o mostrado por parte del D_1R podrían explicar las diferencias observadas en relación a las modulaciones alostércias entre D_1R y H_3R entre distintos tipos celulares y neuronas, aunque es necesario un estudio más profundo de la distribución cerebral de estas subunidades, que a su vez permitiría la aplicación terapéutica de ciertos ligandos selectivos para el heterómero y/o para el subtipo de proteína Gαi/o que interese modular.

En resumen, los resultados expuestos en este trabajo demuestran que la heteromerización de receptores y las consecuentes modulaciones alostéricas que se producen entre protómeros pueden conllevar una regulación funcional recíproca e incluso la aparición de nuevas propiedades bioquímicas, como cambios en la afinidad de unión a ligando o la capacidad de activar nuevas proteínas, como sucede en el caso del D_1R y los subtipos de proteína Gαo2 y Gαi1. Es importante destacar que la selectividad funcional mostrada por agonistas de $D_{1/5}R$ para activar únicamente dos subtipos de Gαi/o en el complejo heteromérico D_1R-H_3R se produce como resultado de la heteromerización y que se pueden descartar cruzamientos en la señalización que se den en niveles inferiores de la cascada.

La existencia de múltiples isoformas humanas del H_3R, con distinta distribución cerebral y farmacología (Bakker, 2004; García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Leurs et al., 2005) podría tener alta relevancia en la señalización histaminérgica *in vivo*, incluyendo las isoformas aparentemente no funcionales, ya que en realidad podrían estar actuando como moduladoras de la expresión de otras isoformas capaces de señalizar, tal como ha sido descrito para algunas isoformas de rata (Bakker et al., 2006) o bien podrían tener cierto grado de actividad constitutiva (Bongers et al., 2007; Rouleau et al., 2002) importantes para el mantenimiento del tono basal de la señalización histaminérgica, por mucho que parezcan poco o nada funcionales al ser activadas por agonsitas de H_3R. Por lo tanto, debido a la posibilidad de que muchos de los efectos observados *in vivo* se deban a la activación de múltiples isoformas del H_3R, se han querido explorar y caracterizar algunas de las posibles diferencias funcionales existentes entre isoformas de este receptor, con el objetivo de aumentar el conocimiento al respecto de la señalización global que se produce cuando se aplican tratamientos con ligandos selectivos de H_3R.

En el manuscrito en preparación/en vías de publicación ***"Human histamine H_3 receptor isoform bias: modulation by heteromerization with dopamine D_1 receptors"*** se han caracterizado diferencias funcionales entre 4 isoformas distintas del H_3R que difieren principalmente en la longitud de su región ICL3 y cuyo nombre viene dado por el número total de aminoácidos de su secuencia: H_3R329, H_3R365, H_3R415 y H_3R445. En este trabajo se ha confirmado que la región ICL3 resulta decisiva para la unión y activación de efectores. Las isoformas con una región ICL3 más corta, H_3R329 y H_3R365, han mostrado una muy baja o ausente activación de las dos vías principales de activación de los GPCRs, la mediada por proteína G y el reclutamiento de β-arrestinas, respectivamente, comparado con las isoformas con una región ICL3 más larga, H_3R415 y H_3R445, un fenómeno que se ha propuesto como una selectividad funcional dependiente de isoforma (Riddy et al., 2017).

En este trabajo también se ha estudiado el perfil diferencial de activación de los distintos subtipos de proteína Gαi/o, en este caso para distintas isoformas del H_3R. Mediante ensayos de BRET por activación de proteína G se han obtenido los distintos perfiles de activación, en los que las isoformas cortas H_3R329 y H_3R365 muestran una mayor preferencia de activación de proteínas Gαi2 y una peor potencia activando proteínas Gαo1, mientras que, sorprendentemente, las isoformas largas han mostrado unas preferencias de activación opuestas, exhibiendo su mejor potencia para Gαo1 y su peor para Gαi2 (y proteínas Gαi3). En relación a la eficacia, las isoformas cortas han mostrado una muy baja activación, en comparación con las isoformas largas, de todos los subtipos de proteínas Gαi/o excepto para Gαi2 en el caso de H_3R365, hecho que explicaría la funcionalidad previamente reportada para esta isoforma (Bongers et al., 2007; Riddy et al., 2017; Wellendorph et al., 2002). En general, los agonistas de H_3R son más potentes y menos eficaces activando las isoformas cortas que las largas, excepto en el caso de la subunidad Gαo1, para la cual las potencias muestran un perfil invertido. Esto significa que, en aquellas células que expresen niveles relativamente altos de proteína Gαo1, las isoformas largas serán más potentes y más eficaces que las isoformas cortas, mientras que sucederá al contrario en aquellas células en las que la subunidad Gαo1 no se exprese o lo haga a bajos niveles en relación al resto de subtipos de subunidades Gαi/o. Por lo tanto, en función de cuál sea el perfil de expresión celular de subunidades Gαi/o, las isoformas de H_3R allí expresadas (que esto a su vez dependerá de la región cerebral) mostrarán distintos perfiles farmacológicos, hecho que *in vivo* conferiría un nivel superior de regulación de la neurotransmisión por parte del sistema histaminérgico.

Asimismo, los niveles obtenidos de cAMP celulares están en concordancia con la selectividad funcional dependiente de isoforma observada mediante los ensayos de BRET por activación de proteína G, lo que demuestra la fiabilidad de esta técnica para el estudio de la vía de señalización

dependiente de proteína G, siempre teniendo en consideración la línea celular utilizada. Las células HEK293T son una herramienta apropiada para el estudio de esta vía de señalización, ya que de forma endógena expresa principalmente los subtipos Gαi1, Gαi2 y Gαi3 (Atwood et al., 2011), que están implicados en la inhibición de la AC, mientras que los subtipos Gαo1 y Gαo2, que no muestran niveles de expresión significativos en esta línea celular, tienen como efectores preferentes a canales de Ca^{2+}, Na^{+} y K^{+} (Cohen-Armon and Sokolovsky, 1993; Liu et al., 1994; VanDongen et al., 1988). Los ensayos de determinación de cAMP también han evidenciado la existencia de actividad constitutiva en las cuatro isoformas de H_3R, siendo ésta ligeramente superior en el caso de la H_3R365, de acuerdo a resultados reportados por otros grupos (Bongers et al., 2007). Se ha sugerido que esta elevada actividad constitutiva de la isofroma H_3R365 sería la responsable en gran medida de la inhibición tónica observada en la frecuencia de disparo de las neuronas histaminérgicas, en las que el tratamiento con agonistas inversos como la tioperamida ha mostrado ser capaz de aumentar esta frecuencia (Arrang et al., 2007; Eriksson et al., 2004; Stevens et al., 2001).

Otro mecanismo de regulación de la señalización neuronal por parte de las isoformas de H_3R, además de sus diferencias farmacológicas y funcionales, puede deberse a su interacción con otras proteínas y los posibles consecuentes cambios en su señalización. Por ello, también se ha querido estudiar la capacidad de las isoformas de H_3R de interaccionar con otros receptores, tal como ha sido reportado para la isoforma H_3R445 con el D_1R y el NMDAR (Ferrada et al., 2009; Moreno et al., 2011, 2014; Rodríguez-Ruiz et al., 2016). En este trabajo no sólo se ha demostrado la posibilidad de que las isoformas de H_3R formen heterómeros con el D_1R, con el NMDAR y con ambos receptores simultáneamente, mostrando distinto grado de afinidades entre las isoformas de H_3R, sino que también se han detectado algunos cambios importantes en su señalización como consecuencia de su heteromerización con el D_1R. En la señalización mediada por proteínas Gαi/o, la presencia del D_1R ha causado un favorecimiento de la señalización histaminérgica en todas las isoformas de H_3R, ya sea por mejoras en la potencia, la eficacia o ambas, de los agonistas de H_3R. En concreto, es importante destacar que la cotransfección del D_1R ha causado la desaparición del perfil invertido que las isoformas solas muestran con la subunidad Gαo1, debido a que el D_1R ha conferido un aumento sustancial de su potencia de activación a las isoformas cortas, las mismas isoformas que han mostrado una afinidad significativamente mayor por el D_1R. De igual importancia son los resultados obtenidos con los experimentos de reclutamiento de β-arrestinas, que muestran cómo la cotransfección del D_1R otorga la capacidad de reclutar β-arrestina I a las isoformas cortas H_3R329 y H_3R365, las cuales en ausencia de D_1R son incapaces de hacerlo, y también al agonista RAMH a través de H_3R445, provocando la desaparición de ambos tipos de selectividad funcional, la dependiente de ligando y la dependiente de isoforma.

Finalmente, en este trabajo también se ha demostrado que los valores de $BRET_{50}$ obtenidos en las curvas de saturación de BRET necesitan ser referidos a la cantidad real equivalente de receptor expresado, ya que los niveles de fluorescencia pueden variar debido a la adopción por parte de la YFP de distintas conformaciones dependiendo del receptor al cual se ha fusionado y a la probable interacción diferencial de este receptor con otras proteínas en la célula. De hecho, los resultados obtenidos en este estudio muestran que las afinidades relativas inferidas a partir de los valores de $BRET_{50}$ no son exactamente equivalentes a las afinidades deducidas a partir de las correlaciones con los niveles reales de expresión de los receptores, especialmente en el caso de la isoforma H_3R445.

En resumen, los resultados contenidos en este último trabajo muestran la existencia de una selectividad funcional dependiente de isoforma a nivel de activación de proteína Gαi/o, de producción de cAMP y de reclutamiento de β-arrestina I, que puede representar un importante

mecanismo para la regulación histaminérgica de la neurotransmisión global, ya que ha sido descrito que el H_3R, probablemente mediante las isoformas H_3R365 en humanos y H_3R413 en rata, pueden actuar no sólo como autoreceptores sino también como heteroreceptores en las terminales neuronales presinápticas (García-Gálvez and Arias-Montaño, 2016; Gbahou et al., 2012; Haas et al., 2008; Nieto-Alamilla et al., 2016; Schlicker and Kathmann, 2017). Además, las demostradas interacciones entre las isoformas de H_3R y el D_1R han mostrado de nuevo la importancia a nivel funcional de la heteromerización de receptores, añadiendo mayor nivel de complejidad a la señalización histaminérgica.

Teniendo en cuenta la posibilidad de modular alostéricamente el complejo heteromérico D_1R-H_3R mediante antagonistas que actúen sobre el H_3R o bien simultáneamente sobre éste y otros receptores con los que el H_3R ha demostrado capacidad de interacción y/o modulación, como son el σ_1R y el NMDAR, consideramos que el diseño de nuevos fármacos, así como su análisis farmacológico, deberían ser desarrollados considerando la oportunidad de actuar de forma selectiva sobre complejos heteroméricos que incluyan a receptores neuromoduladores, en lugar de actuar directamente sobre receptores de neurotransmisores excitatorios o inhibitorios o sobre los homómeros de receptores, que muy probablemente exhibirán mayores efectos secundarios.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos al abordar el **primer Objetivo** de esta Tesis, se puede inferir la siguiente conclusión:

Los receptores de dopamina D_1 y los de histamina H_3 forman complejos heterotriméricos con el receptor sigma-1 y el tratamiento con cocaína, a través de su unión al receptor sigma-1, modifica las propiedades bioquímicas de la heteromerización entre los receptores D_1 y H_3, de manera que ligandos del receptor H_3 no son capaces de inhibir los efectos inducidos por la activación del receptor D_1, incluida la muerte celular.

De forma más precisa, de los resultados derivados del primer Objetivo se pueden extraer las siguientes conclusiones específicas:

- El receptor σ_1 se une al heterómero de receptores D_1-H_3 a través de su interacción directa con el receptor D_1, en células HEK293T transfectadas y en el núcleo estriado de rata y ratón.

- Agonistas del receptor σ_1 como la cocaína modifican la estructura y anulan las propiedades bioquímicas del heterómero de receptores D_1-H_3, las cuales consisten en la habilidad del receptor H_3 de señalizar a través de la vía de las MAPKs y en la habilidad de ligandos de H_3 de inhibir los efectos mediados por la activación del receptor D_1, incluida la muerte celular.

- El bloqueo de la inhibición que el receptor H_3 ejerce sobre la función del receptor D_1 en los complejos heteroméricos de receptores σ_1-D_1-H_3, juega un papel fundamental en los efectos causados por la cocaína y sugiere que estos complejos son una nueva diana para el tratamiento de la adicción a cocaína, el cual podría consistir en la coadministración de antagonistas del receptor σ_1 y del receptor H_3.

De los resultados obtenidos al abordar el **segundo Objetivo** de esta Tesis, se puede inferir la siguiente conclusión:

Los receptores de dopamina D_1 y de histamina H_3 forman heterómeros tanto en células modelo de la enfermedad de Huntington como en la corteza, núcleo estriado e hipocampo de ratones modelo de la enfermedad de Huntington y el tratamiento temprano de éstos con tioperamida, un antagonista del receptor H_3, previene la pérdida de expresión del heterómero de receptores D_1-H_3, la muerte celular y la aparición de déficits cognitivos.

De forma más precisa, de los resultados derivados del segundo Objetivo se pueden extraer las siguientes conclusiones específicas:

- En un modelo celular de la enfermedad de Huntington en que se ha comprobado que la proteína huntingtina no afecta a los niveles de expresión ni a la heteromerización de los receptores D_1 y H_3, el antagonista del receptor H_3 tioperamida inhibe la señalización inducida por el receptor D_1 y la muerte celular causada por la sobreactivación de receptores D_1, modulando la movilización de calcio y la fosforilación de p38 mediante el fenómeno de antagonismo cruzado. Concretamente, la interacción entre los receptores D_1 y H_3 por el segmento transmembrana 5 del receptor D_1 resulta necesaria para la manifestación del

fingerprint bioquímico del heterómero, es decir, para que el receptor H_3 actúe como freno molecular del receptor D_1.

- En un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington en que los receptores D_1 y H_3 se expresan, son funcionales y son capaces de heteromerizar, a los 8 meses de edad se produce una pérdida de la heteromerización entre receptores D_1-H_3 y con ella la capacidad de la tioperamida de prevenir la muerte celular causada por la sobreactivación del D_1R. En estadios previos, concretamente a los 6 meses de edad, se observa una pérdida de densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales CA1 de hipocampo y en neuronas de las capas I, II y III de la corteza motora, que es revertida con el tratamiento de tioperamida. En el núcleo estriado la tioperamida revierte ligeramente la expresión alterada de receptores de adenosina A_{2A}, p75NTR, PDE10A y BDNF, pero no ejerce ningún efecto sobre la eliminación de cúmulos de proteína huntingtina mutada. El tratamiento con tioperamida previene déficits cognitivos y de aprendizaje motor a largo plazo, así como la pérdida de expresión del heterómero de receptores D_1-H_3 a los 6 meses de edad, pero no a los 8 meses cuando ya se ha producido la pérdida de expresión del heterómero.

- Heterómeros de receptores D_1-H_3 se expresan en el núcleo estriado de humanos control y con grado 0, 1 y 2 de evolución de la enfermedad de Huntington, mientras que no lo hacen en pacientes con grado 3-4, hecho que correlaciona con el patrón de expresión en el modelo animal.

De los resultados obtenidos al abordar el **tercer Objetivo** de esta Tesis, se puede inferir la siguiente conclusión:

Los receptores de dopamina D_1 y los de histamina H_3 forman complejos heterotriméricos con el receptor glutamatérgico de NMDA en la corteza cerebral de rata y en la de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer, existiendo una regulación negativa por parte de antagonistas del receptor H_3 sobre la señalización e inducción de muerte celular excitotóxica inducida por la sobreactivación tanto del receptor D_1 como del receptor de NMDA.

De forma más precisa, de los resultados derivados del tercer Objetivo se pueden extraer las siguientes conclusiones específicas:

- Los receptores de dopamina D_1, de histamina H_3 y de NMDA son capaces de formar complejos proteicos en células HEK293T transfectadas y en tejido cortical de rata y de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer.

- El tratamiento con antagonistas de receptores D_1 o H_3 previene la muerte celular inducida por la sobreactivación del receptor NMDA, y el tratamiento con antagonistas de receptores NMDA o H_3 previene la muerte celular inducida por la sobreactivación de receptores D_1, sugiriendo una interacción funcional compleja entre los receptores NMDA y los heterómeros de receptores D_1-H_3.

- Los receptores H_3, en los complejos de receptores D_1-H_3-NMDA, son dianas prometedoras para prevenir la neurodegeneración mediante el tratamiento con antagonistas del receptor H_3 que presenten capacidad neuroprotectora.

De los resultados obtenidos al abordar el **cuarto Objetivo** de esta Tesis, se puede inferir la siguiente conclusión:

Se han identificado ligandos del receptor de histamina H_3 capaces de modular alostéricamente la unión de la dopamina al receptor D_1 y se ha determinado que, bajo el heterotetrámero de receptores D_1-H_3, se mantienen tanto la proteína Gαs como la Gαi de cada homodímero de receptores, aunque los receptores D_1 son capaces de activar también proteína Gαi1 y Gαo2 a dosis elevadas de agonista. En circunstancias de coactivación dopaminérgica e histaminérgica del heterómero, ligandos selectivos del receptor D_1 favorecen la activación de Gαi por parte de la histamina, mientras que ligandos selectivos del receptor H_3 modulan negativamente la activación de Gαs inducida por dopamina. El receptor H_3 es capaz de activar los 5 subtipos conocidos de proteína Gαi/o y la histamina presenta una mayor potencia al activar el subtipo Gαo1 y una menor potencia para los subtipos Gαi2 y Gαi3, mientras que el receptor D_1 únicamente puede activar los subtipos Gαi1 y Gαo2, revelando por tanto la existencia de selectividad funcional a nivel de activación de distintos subtipos de proteína Gαi/o.

De forma más precisa, de los resultados derivados del cuarto Objetivo se pueden extraer las siguientes conclusiones específicas:

- Los ligandos histaminérgicos que, actuando sobre el receptor H_3, han mostrado una mayor modulación alostérica sobre la unión de la dopamina al receptor D_1, lo han hecho mejorando la unión de ésta al segundo protómero del homodímero de receptores D_1-D_1, llegando en algunos casos a causar la desaparición total de la cooperatividad negativa subyacente.

- Cuando el receptor D_1 se encuentra formando complejos heteroméricos con el receptor H_3, agonistas selectivos del receptor D_1 adquieren la capacidad de movilizar Gαi1 y Gαo2 a dosis elevadas y mejoran la potencia de activación de la histamina, mientras que agonistas selectivos de H_3 no son capaces de movilizar Gαs pero empeoran la potencia de activación de esta proteína G por parte de la dopamina.

- El heterómero D_1-H_3 forma estructuras heteroteraméricas compuestas por un homodímero de cada receptor que mantiene la unión a su proteína G canónica, mientras que en ningún caso se ha observado movilización de proteína Gαq.

- El receptor H_3 es capaz de activar los 5 subtipos conocidos de proteína Gαi/o y la histamina presenta su mayor potencia al activar el subtipo Gαo1 y su menor potencia con los subtipos Gαi2 y Gαi3, mostrando por tanto selectividad funcional entre subtipos de proteína Gαi/o.

De los resultados obtenidos al abordar el **quinto Objetivo** de esta Tesis, se puede inferir la siguiente conclusión:

Las isoformas 329, 365, 415 y 445 del receptor de histamina H_3 presentan distinto grado de funcionalidad en proporción inversa al nivel de deleción de su secuencia en el tercer bucle intracelular y son capaces de formar heterómeros tanto con el receptor de dopamina D_1 como con el receptor glutamatérgico de NMDA, así como complejos heterotriméricos con ambos receptores en células transfectadas. La heteromerización de estas isoformas del receptor H_3 con el receptor D_1 provoca una clara modulación positiva de la existente selectividad funcional dependiente de isoforma, tanto a nivel de activación de proteínas Gαi/o como del reclutamiento de β-arrestina I.

De forma más precisa, de los resultados derivados del quinto Objetivo se pueden extraer las siguientes conclusiones específicas:

- Todas las isoformas del receptor H_3 pueden heteromerizar con los receptores D_1 y de NMDA, así como formar complejos heterotriméricos con ambos receptores.

- Las isoformas del receptor H_3 presentan selectividad funcional como consecuencia de la deleción en su tercer bucle intracelular, por lo que las isoformas más cortas, de 329 y 365 aminoácidos, muestran una extremadamente baja activación de los distintos subtipos de proteína Gαi/o, excepto en el caso de la segunda isoforma, que muestra una clara activación de Gαi2, mientras que las isoformas de 415 y 445 aminoácidos activan notablemente todos los subtipos de Gαi/o, aunque la primera lo hace en un grado ligeramente inferior a la segunda. Este distinto grado de funcionalidad corresponde a la llamada selectividad funcional dependiente de isoforma.

- El agonista selectivo de H_3 RAMH muestra una funcionalidad selectiva al actuar sobre la isoforma de H_3 de 445 aminoácidos, ya que no es capaz de movilizar β-arrestina I pero sí de activar todos los subtipos de proteína Gαi/o y de promover disminuciones de AMPc celulares. Esta funcionalidad selectiva desaparece cuando esta isoforma de H_3 heteromeriza con el receptor D_1.

- Las isoformas con mayor deleción de 329 y 365 aminoácidos no movilizan β-arrestina I con ningún agonista selectivo del receptor H_3, mientras que sí puede hacerlo la isoforma 445, observándose de nuevo una selectividad funcional dependiente de isoforma, la cual desaparece tras su heteromerización con el receptor D_1, capacitando a las isoformas 329 y 365 para reclutar β-arrestina I.

Del conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, se deriva la siguiente **conclusión global:**

Dada la capacidad de los ligandos histaminérgicos de modular negativamente la señalización inducida por el receptor de dopamina D_1 y por el receptor glutamatérgico NMDA, a través de su acción sobre receptores histaminérgicos H_3 y sus múltiples isoformas que se encuentran interactuando y modulando alostéricamente a estos receptores, no sólo molecularmente sino también funcionalmente llegando a prevenir la muerte neuronal originada tras su sobreactivación, se concluye que antagonistas selectivos de H_3 son fármacos potencialmente efectivos para el tratamiento de múltiples desórdenes neurológicos como la adicción a sustancias de abuso, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, que además presentan la ventaja de un bajo riesgo de causar efectos secundarios por tratarse de antagonistas y por su actuación sobre un sistema modulador como es el histaminérgico, en lugar de una actuación directa sobre sistemas neurotransmisores excitatorios o inhibitorios.

5. CONCLUSIONS

The conclusion derived from **chapter 1**, corresponding to aim 1 of this Thesis are:

Dopamine D_1 and histamine H_3 receptors form heterotrimeric complexes with sigma-1 receptor and cocaine binding to sigma-1 receptor in the σ_1-D_1-H_3 heteromeric complexes blocks the ability of H_3 receptor selective ligands to inhibit the effects induced by D_1-receptor activation, included cell death. This finding represents a new mechanism of action of cocaine and suggest σ_1-D_1-H_3 heteromeric complexes as potential targets for the treatment of cocaine addiction.

The conclusions derived from **chapter 2**, corresponding to aim 2 of this Thesis are:

Dopamine D_1 and histamine H_3 receptors form heteromers both in cells and in cortex, striatum and hippocampus of a mice model of Huntington's disease and the early treatment of animals with thioperamide, an H_3 receptor antagonist, prevents the loss of expression of D_1-H_3 receptor heteromers, the cell death and the appearance of cognitive and motor learning deficits.

The conclusions derived from **chapter 3**, corresponding to aim 3 of this Thesis are:

Dopamine D_1 and histamine H_3 receptors form heterotrimeric complexes with glutamate NMDA receptor in transfected cells, in rat cortex and in cortex from a mice model of Alzheimer's disease, in which H_3 receptor antagonists exerts a negative regulation on the signaling and excitotoxic cell-death induced by overactivation of either the D_1 receptor or the NMDA receptor. Thus, H_3 receptors in the D_1-H_3-NMDA receptor complexes are potential targets to prevent neurodegeneration by the treatment with H_3 receptor antagonists that present neuroprotective capacity.

The conclusions derived from **chapter 4**, corresponding to aim 4 of this Thesis are:

Several H_3 receptor ligands has been identified with the ability to allosterically modulate dopamine D_1 receptors at the level of dopamine binding to the second protomer of D_1-D_1 receptor homodimers within D_1-D_1-H_3-H_3 heterotetrameric complexes. These complexes are bound to both Gαs and Gαi subunits of G proteins and maintain its canonical signaling, although D_1-like receptor agonists can also activate Gαi proteins at high doses. Under dopaminergic and histaminergic coactivation, D_1-like receptor agonists improve the Gαi activation by histamine, whereas H_3 receptor agonists negatively modulate Gαs activation by dopamine. The H_3 receptor can activate the five subtypes of Gαi/o proteins and histamine show its highest potency activating Gαo1 and its lowest activating Gαi2 and Gαi3 protein subtypes, whereas D_1 receptor can only activate $G\alpha_{i1}$ and $G\alpha_{o2}$ protein subtypes, revealing the existence of functional selectivity at the level of Gαi/o protein subtype activation.

The conclusions derived from **chapter 5**, corresponding to aim 5 of this Thesis are:

Histamine H_3 receptor isoforms 329, 365, 415 and 445 show distinct degree of functionality in an inverse proportion to the level of deletion of their third intracellular loop and can form heteromers with dopamine D_1, glutamate NMDA and with both receptors simultaneously in transfected cells. As a result of D_1 receptor heteromerization with H_3-receptor isoforms, there is a positive modulation over the isoform-biased signaling at the level of Gαi/o protein activation and βI-arrestin recruitment.

The global conclusion derived from this Thesis is:

Due to the ability of histaminergic ligands to negatively modulate the signaling induced by dopamine D_1 and glutamate NMDA receptors, by its action on histamine H_3 receptor and its multiple isoforms that are found interacting and allosterically modulating these receptors, not only at the molecular level but also affecting their functionality with the possibility to prevent cell death induced by overactivation of these receptors, we can conclude that H_3 receptor selective antagonists are potentially effective drugs for the treatment of multiple neurologic disorders as addiction, Huntington's disease or Alzheimer's disease. Furthermore, these compounds show the benefit of having a lower risk to cause secondary effects, since they are antagonists, and because of its action on a modulatory system as the histaminergic, rather than acting directly on excitatory or inhibitory neurotransmitter systems.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Abi-Dargham, A., Rodenhiser, J., Printz, D., Zea-Ponce, Y., Gil, R., Kegeles, L.S., Weiss, R., Cooper, T.B., Mann, J.J., Van Heertum, R.L., et al. (2000). Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 8104–8109.

Abraham, W.C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 387.

Ady, V., Perroy, J., Tricoire, L., Piochon, C., Dadak, S., Chen, X., Dusart, I., Fagni, L., Lambolez, B., and Levenes, C. (2014). Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluD2 delta glutamate receptors. EMBO Rep. *15*, 103–109.

Agnati, L.F., Fuxe, K., and Ferré, S. (2005a). How receptor mosaics decode transmitter signals. Possible relevance of cooperativity. Trends Biochem. Sci. *30*, 188–193.

Agnati, L.F., Ferre, S., Burioni, R., Woods, A., Genedani, S., Franco, R., and Fuxe, K. (2005b). Existence and theoretical aspects of homomeric and heteromeric dopamine receptor complexes and their relevance for neurological diseases. Neuromolecular Med. *7*, 61–78.

Airaksinen, M.S., Paetau, A., Paljärvi, L., Reinikainen, K., Riekkinen, P., Suomalainen, R., and Panula, P. (1991). Histamine neurons in human hypothalamus: anatomy in normal and Alzheimer diseased brains. Neuroscience *44*, 465–481.

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. J. Comp. Neurol. *347*, 150–160.

Albin Roger L., Reiner Anton, Anderson Keith D., Dure Leon S., Handelin Barbara, Balfour Rosemary, Whetsell William O., Penney John B., and Young Anne B. (2004). Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. Ann. Neurol. *31*, 425–430.

Albizu, L., Cottet, M., Kralikova, M., Stoev, S., Seyer, R., Brabet, I., Roux, T., Bazin, H., Bourrier, E., Lamarque, L., et al. (2010). Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. Nat. Chem. Biol. *6*, 587–594.

Alfaro-Rodriguez, A., Alonso-Spilsbury, M., Arch-Tirado, E., Gonzalez-Pina, R., Arias-Montaño, J.-A., and Bueno-Nava, A. (2013). Histamine H3 receptor activation prevents dopamine D1 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum: a microdialysis study. Neurosci. Lett. *552*, 5–9.

Ali, M.H., and Imperiali, B. (2005). Protein oligomerization: how and why. Bioorg. Med. Chem. *13*, 5013–5020.

Al-Saif, A., Al-Mohanna, F., and Bohlega, S. (2011). A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *70*, 913–919.

Alvarez, E.O. (2009). The role of histamine on cognition. Behav. Brain Res. *199*, 183–189.

Anand, R., Gill, K.D., and Mahdi, A.A. (2014). Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. Neuropharmacology *76*, 27–50.

Anderson, S.M., and Pierce, R.C. (2005). Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. Pharmacol. Ther. *106*, 389–403.

André, V.M., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2010a). Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. CNS Neurosci. Ther. *16*, 163–178.

André, V.M., Cepeda, C., Cummings, D.M., Jocoy, E.L., Fisher, Y.E., William Yang, X., and Levine, M.S. (2010b). Dopamine modulation of excitatory currents in the striatum is dictated by the expression of D1 or D2 receptors and modified by endocannabinoids. Eur. J. Neurosci. *31*, 14–28.

Anichtchik, O.V., Peitsaro, N., Rinne, J.O., Kalimo, H., and Panula, P. (2001). Distribution and modulation of histamine H(3) receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with Parkinson's disease. Neurobiol. Dis. *8*, 707–716.

Apelt, J., Ach, K., and Schliebs, R. (2003). Aging-related down-regulation of neprilysin, a putative beta-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of beta-amyloid plaques. Neurosci. Lett. *339*, 183–186.

Aquino-Miranda, G., Molina-Hernández, A., and Arias-Montaño, J.-A. (2012). [Regulation by histamine H3 receptors of neurotransmitter release in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease pathophysiology]. Gac. Med. Mex. *148*, 467–475.

Arias-Montaño, J.A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., and Young, J.M. (2001). Histamine H(3) receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D(1) receptor-dependent release of [(3)H]-gamma-aminobutryic acid from rat striatal slices. Br. J. Pharmacol. *133*, 165–171.

Armato, U., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., and Whitfield, J.F. (2013). Alzheimer's disease: an update of the roles of receptors, astrocytes and primary cilia (review). Int. J. Mol. Med. *31*, 3–10.

Armstrong, R.A. (2014). A critical analysis of the "amyloid cascade hypothesis." Folia Neuropathol. *52*, 211–225.

Arrang, J.M., Garbarg, M., and Schwartz, J.C. (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. Nature *302*, 832–837.

Arrang, J.-M., Morisset, S., and Gbahou, F. (2007). Constitutive activity of the histamine H3 receptor. Trends Pharmacol. Sci. *28*, 350–357.

Arrasate, M., and Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. Exp. Neurol. *238*, 1–11.

Atwood, B.K., Lopez, J., Wager-Miller, J., Mackie, K., and Straiker, A. (2011). Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. BMC Genomics *12*, 14.

Ayano, G. (2016). Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. J. Ment. Disord. Treat. *2*, 1–4.

Ayoub, M.A., and Pfleger, K.D.G. (2010). Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. Curr. Opin. Pharmacol. *10*, 44–52.

Azzi, M., Charest, P.G., Angers, S., Rousseau, G., Kohout, T., Bouvier, M., and Piñeyro, G. (2003). Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 11406–11411.

Bahouth, S.W., and Nooh, M.M. (2017). Barcoding of GPCR trafficking and signaling through the various trafficking roadmaps by compartmentalized signaling networks. Cell. Signal. *36*, 42–55.

Baker, D.A., Xi, Z.-X., Shen, H., Swanson, C.J., and Kalivas, P.W. (2002). The origin and neuronal function of in vivo nonsynaptic glutamate. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *22*, 9134–9141.

Bakker, R.A. (2004). Histamine H3-receptor isoforms. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *53*, 509–516.

Bakker, R.A., Wieland, K., Timmerman, H., and Leurs, R. (2000). Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. Eur. J. Pharmacol. *387*, R5-7.

Bakker, R.A., Lozada, A.F., Marle, A. van, Shenton, F.C., Drutel, G., Karlstedt, K., Hoffmann, M., Lintunen, M., Yamamoto, Y., Rijn, R.M. van, et al. (2006). Discovery of Naturally Occurring Splice Variants of the Rat Histamine H3 Receptor That Act as Dominant-Negative Isoforms. Mol. Pharmacol. *69*, 1194–1206.

Balasuriya, D., Stewart, A.P., and Edwardson, J.M. (2013). The σ-1 receptor interacts directly with GluN1 but not GluN2A in the GluN1/GluN2A NMDA receptor. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 18219–18224.

Bananej, M., Karimi-Sori, A., Zarrindast, M.R., and Ahmadi, S. (2012). D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. *26*, 564–574.

Baranello, R.J., Bharani, K.L., Padmaraju, V., Chopra, N., Lahiri, D.K., Greig, N.H., Pappolla, M.A., and Sambamurti, K. (2015). Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *12*, 32–46.

Barco, A., Bailey, C.H., and Kandel, E.R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. J. Neurochem. *97*, 1520–1533.

Bard, L., and Groc, L. (2011). Glutamate receptor dynamics and protein interaction: Lessons from the NMDA receptor. Mol. Cell. Neurosci. *48*, 298–307.

Bardgett, M.E., Davis, N.N., Schultheis, P.J., and Griffith, M.S. (2011). Ciproxifan, an H3 receptor antagonist, alleviates hyperactivity and cognitive deficits in the APP Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. Neurobiol. Learn. Mem. *95*, 64–72.

Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., and Bellone, C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. J. Neurochem. *139*, 1071–1080.

Barria, A., and Malinow, R. (2002). Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. Neuron *35*, 345–353.

Bates, G.P., Dorsey, R., Gusella, J.F., Hayden, M.R., Kay, C., Leavitt, B.R., Nance, M., Ross, C.A., Scahill, R.I., Wetzel, R., et al. (2015). Huntington disease. Nat. Rev. Dis. Primer *1*, 15005.

Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G., Oprian, D.D., and Sligar, S.G. (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. J. Biol. Chem. *282*, 14875–14881.

Beaulieu, J.-M., and Caron, M.G. (2005). Beta-arrestin goes nuclear. Cell *123*, 755–757.

Beaulieu, J.-M., and Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol. Rev. *63*, 182–217.

Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., and Gainetdinov, R.R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. Br. J. Pharmacol. *172*, 1–23.

Bechtholt-Gompf, A.J., Walther, H.V., Adams, M.A., Carlezon, W.A., Ongür, D., and Cohen, B.M. (2010). Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *35*, 2049–2059.

Becker, A., Grecksch, G., Kraus, J., Peters, B., Schroeder, H., Schulz, S., and Höllt, V. (2001). Loss of locomotor sensitisation in response to morphine in D1 receptor deficient mice. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *363*, 562–568.

Beermann, S., Seifert, R., and Neumann, D. (2012). Commercially available antibodies against human and murine histamine H_4-receptor lack specificity. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *385*, 125–135.

Beninger, R.J., and Miller, R. (1998). Dopamine D1-like receptors and reward-related incentive learning. Neurosci. Biobehav. Rev. *22*, 335–345.

Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.-Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., and Kopito, R.R. (2007). Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. Nature *448*, 704–708.

Benredjem, B., Dallaire, P., and Pineyro, G. (2017). Analyzing biased responses of GPCR ligands. Curr. Opin. Pharmacol. *32*, 71–76.

Bergson, C., Mrzljak, L., Smiley, J.F., Pappy, M., Levenson, R., and Goldman-Rakic, P.S. (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *15*, 7821–7836.

Berlin, M., Boyce, C.W., and Ruiz, M. de L. (2011). Histamine H3 receptor as a drug discovery target. J. Med. Chem. *54*, 26–53.

Bernardino, L., Eiriz, M.F., Santos, T., Xapelli, S., Grade, S., Rosa, A.I., Cortes, L., Ferreira, R., Bragança, J., Agasse, F., et al. (2012). Histamine stimulates neurogenesis in the rodent subventricular zone. Stem Cells Dayt. Ohio *30*, 773–784.

Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Hervé, D., Valjent, E., and Girault, J.-A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 5671–5685.

Betke, K.M., Rose, K.L., Friedman, D.B., Baucum, A.J., Hyde, K., Schey, K.L., and Hamm, H.E. (2014). Differential localization of G protein βγ subunits. Biochemistry (Mosc.) *53*, 2329–2343.

Beuming, T., Kniazeff, J., Bergmann, M.L., Shi, L., Gracia, L., Raniszewska, K., Newman, A.H., Javitch, J.A., Weinstein, H., Gether, U., et al. (2008). The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. Nat. Neurosci. *11*, 780–789.

Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. Nat. Neurosci. *7*, 613–620.

Bi, F., Huang, C., Tong, J., Qiu, G., Huang, B., Wu, Q., Li, F., Xu, Z., Bowser, R., Xia, X.-G., et al. (2013). Reactive astrocytes secrete lcn2 to promote neuron death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 4069–4074.

Bibb, J.A., Snyder, G.L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A.A., Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J.A., Czernik, A.J., et al. (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. Nature *402*, 669–671.

Bibb, J.A., Chen, J., Taylor, J.R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G.L., Yan, Z., Sagawa, Z.K., Ouimet, C.C., Nairn, A.C., et al. (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. Nature *410*, 376–380.

Bitner, R.S., Markosyan, S., Nikkel, A.L., and Brioni, J.D. (2011). In-vivo histamine H3 receptor antagonism activates cellular signaling suggestive of symptomatic and disease modifying efficacy in Alzheimer's disease. Neuropharmacology *60*, 460–466.

Björklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. Trends Neurosci. *30*, 194–202.

Blandina, P., Munari, L., Provensi, G., and Passani, M.B. (2012). Histamine neurons in the tuberomamillary nucleus: a whole center or distinct subpopulations? Front. Syst. Neurosci. *6*, 33.

Blank, T., Nijholt, I., Teichert, U., Kügler, H., Behrsing, H., Fienberg, A., Greengard, P., and Spiess, J. (1997). The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 14859–14864.

Blum, D., Martire, A., Burnouf, S., Sablonnière, B., Krystkowiak, P., Ledent, C., Lopes, L.V., and Popoli, P. (2013). Adenosine Receptors in Huntington's Disease. In Adenosine, (Springer, New York, NY), pp. 409–434.

Bogoyevitch, M.A., and Court, N.W. (2004). Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. Cell. Signal. *16*, 1345–1354.

Bolam, J.P., and Ellender, T.J. (2016). Histamine and the striatum. Neuropharmacology *106*, 74–84.

Bonaventura, J., Navarro, G., Casadó-Anguera, V., Azdad, K., Rea, W., Moreno, E., Brugarolas, M., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., et al. (2015). Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E3609-3618.

Bongers, G., Krueger, K.M., Miller, T.R., Baranowski, J.L., Estvander, B.R., Witte, D.G., Strakhova, M.I., van Meer, P., Bakker, R.A., Cowart, M.D., et al. (2007a). An 80-amino acid deletion in the third intracellular loop of a naturally occurring human histamine H3 isoform confers pharmacological differences and constitutive activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. *323*, 888–898.

Bongers, G., Sallmen, T., Passani, M.B., Mariottini, C., Wendelin, D., Lozada, A., Marle, A. van, Navis, M., Blandina, P., Bakker, R.A., et al. (2007b). The Akt/GSK-3beta axis as a new signaling pathway of the histamine H(3) receptor. J. Neurochem. *103*, 248–258.

Bongers, G., Bakker, R.A., and Leurs, R. (2007c). Molecular aspects of the histamine H3 receptor. Biochem. Pharmacol. *73*, 1195–1204.

Borcherding, D.C., Hugo, E.R., Idelman, G., De Silva, A., Richtand, N.W., Loftus, J., and Ben-Jonathan, N. (2011). Dopamine receptors in human adipocytes: expression and functions. PloS One *6*, e25537.

Bornert, O., Møller, T.C., Boeuf, J., Candusso, M.-P., Wagner, R., Martinez, K.L., and Simonin, F. (2013). Identification of a novel protein-protein interaction motif mediating interaction of GPCR-associated sorting proteins with G protein-coupled receptors. PloS One *8*, e56336.

Bossert, J.M., Poles, G.C., Wihbey, K.A., Koya, E., and Shaham, Y. (2007). Differential effects of blockade of dopamine D1-family receptors in nucleus accumbens core or shell on reinstatement of heroin seeking induced by contextual and discrete cues. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 12655–12663.

Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 274–286.

Boyd, K.N., and Mailman, R.B. (2012). Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. Handb. Exp. Pharmacol. 53–86.

Braak, H., and Tredici, K.D. (2011). Alzheimer's pathogenesis: is there neuron-to-neuron propagation? Acta Neuropathol. (Berl.) *121*, 589–595.

Brabant, C., Alleva, L., Quertemont, E., and Tirelli, E. (2010). Involvement of the brain histaminergic system in addiction and addiction-related behaviors: a comprehensive review with emphasis on the potential therapeutic use of histaminergic compounds in drug dependence. Prog. Neurobiol. *92*, 421–441.

Brailoiu, G.C., Deliu, E., Console-Bram, L.M., Soboloff, J., Abood, M.E., Unterwald, E.M., and Brailoiu, E. (2016). Cocaine inhibits store-operated Ca2+ entry in brain microvascular endothelial cells: critical role for sigma-1 receptors. Biochem. J. *473*, 1–5.

Brennan, K.A., Carati, C., Lea, R.A., Fitzmaurice, P.S., and Schenk, S. (2009). Effect of D1-like and D2-like receptor antagonists on methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration in rats. Behav. Pharmacol. *20*, 688–694.

Brioni, J.D., Esbenshade, T.A., Garrison, T.R., Bitner, S.R., and Cowart, M.D. (2011). Discovery of histamine H3 antagonists for the treatment of cognitive disorders and Alzheimer's disease. J. Pharmacol. Exp. Ther. *336*, 38–46.

Brito, V., Puigdellívol, M., Giralt, A., Del Toro, D., Alberch, J., and Ginés, S. (2013). Imbalance of p75(NTR)/TrkB protein expression in Huntington's disease: implication for neuroprotective therapies. Cell Death Dis. *4*, e595.

Brito, V., Giralt, A., Enriquez-Barreto, L., Puigdellívol, M., Suelves, N., Zamora-Moratalla, A., Ballesteros, J.J., Martín, E.D., Dominguez-Iturza, N., Morales, M., et al. (2014). Neurotrophin receptor p75(NTR) mediates Huntington's disease-associated synaptic and memory dysfunction. J. Clin. Invest. *124*, 4411–4428.

Brock, C., Oueslati, N., Soler, S., Boudier, L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2007). Activation of a dimeric metabotropic glutamate receptor by intersubunit rearrangement. J. Biol. Chem. *282*, 33000–33008.

Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y., and Zahm, D.S. (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. J. Comp. Neurol. *338*, 255–278.

Broussard, J.I., Yang, K., Levine, A.T., Tsetsenis, T., Jenson, D., Cao, F., Garcia, I., Arenkiel, B.R., Zhou, F.-M., De Biasi, M., et al. (2016). Dopamine Regulates Aversive Contextual Learning and Associated In Vivo Synaptic Plasticity in the Hippocampus. Cell Rep. *14*, 1930–1939.

Browne, S.E., Bowling, A.C., MacGarvey, U., Baik, M.J., Berger, S.C., Muqit, M.M., Bird, E.D., and Beal, M.F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. Ann. Neurol. *41*, 646–653.

Bulgari, D., Deitcher, D.L., and Levitan, E.S. (2017). Loss of Huntingtin stimulates capture of retrograde dense-core vesicles to increase synaptic neuropeptide stores. Eur. J. Cell Biol. *96*, 402–406.

Bunner, K.D., and Rebec, G.V. (2016). Corticostriatal Dysfunction in Huntington's Disease: The Basics. Front. Hum. Neurosci. *10*, 317.

Burban, A., Faucard, R., Armand, V., Bayard, C., Vorobjev, V., and Arrang, J.-M. (2010). Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate receptors by interacting with an allosteric site distinct from the polyamine binding site. J. Pharmacol. Exp. Ther. *332*, 912–921.

Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014). D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. Mol. Psychiatry *19*, 1295–1304.

Cai, Y., Yang, L., Niu, F., Liao, K., and Buch, S. (2017). Role of Sigma-1 Receptor in Cocaine Abuse and Neurodegenerative Disease. Adv. Exp. Med. Biol. *964*, 163–175.

Caine, S.B., Thomsen, M., Gabriel, K.I., Berkowitz, J.S., Gold, L.H., Koob, G.F., Tonegawa, S., Zhang, J., and Xu, M. (2007). Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 13140–13150.

Calebiro, D., Nikolaev, V.O., and Lohse, M.J. (2010a). Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. J. Mol. Endocrinol. *45*, 1–8.

Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Persani, L., and Lohse, M.J. (2010b). Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. Trends Pharmacol. Sci. *31*, 221–228.

Calebiro, D., Rieken, F., Wagner, J., Sungkaworn, T., Zabel, U., Borzi, A., Cocucci, E., Zürn, A., and Lohse, M.J. (2013). Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 743–748.

Callier, S., Snapyan, M., Le Crom, S., Prou, D., Vincent, J.-D., and Vernier, P. (2003). Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. Biol. Cell *95*, 489–502.

Caltabiano, G., Gonzalez, A., Cordomí, A., Campillo, M., and Pardo, L. (2013). The role of hydrophobic amino acids in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors. Methods Enzymol. *520*, 99–115.

Calvo-Flores Guzmán, B., Vinnakota, C., Govindpani, K., Waldvogel, H., Faull, R.L., and Kwakowsky, A. (2018). The GABAergic System as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. J. Neurochem.

Cannon, K.E., and Hough, L.B. (2005). Inhibition of chemical and low-intensity mechanical nociception by activation of histamine H3 receptors. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. *6*, 193–200.

Carati, C., and Schenk, S. (2011). Role of dopamine D1- and D2-like receptor mechanisms in drug-seeking following methamphetamine self-administration in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. *98*, 449–454.

Carlsson, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. Pharmacol. Rev. *11*, 490–493.

Carr, G.V., Maltese, F., Sibley, D.R., Weinberger, D.R., and Papaleo, F. (2017). The Dopamine D5 Receptor Is Involved in Working Memory. Front. Pharmacol. *8*, 666.

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A.S., Hope, B.T., Ciruela, F., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *32*, 2249–2259.

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

Cartmell, J., and Schoepp, D.D. (2000). Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. J. Neurochem. *75*, 889–907.

Carvajal, F.J., Mattison, H.A., and Cerpa, W. (2016). Role of NMDA Receptor-Mediated Glutamatergic Signaling in Chronic and Acute Neuropathologies. Neural Plast. *2016*, 2701526.

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

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

Castany, S., Gris, G., Vela, J.M., Verdú, E., and Boadas-Vaello, P. (2018). Critical role of sigma-1 receptors in central neuropathic pain-related behaviours after mild spinal cord injury in mice. Sci. Rep. *8*, 3873.

Castner, S.A., and Williams, G.V. (2007). Tuning the engine of cognition: a focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. Brain Cogn. *63*, 94–122.

Caviston, J.P., and Holzbaur, E.L.F. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. Trends Cell Biol. *19*, 147–155.

Centonze, D., Grande, C., Saulle, E., Martin, A.B., Gubellini, P., Pavón, N., Pisani, A., Bernardi, G., Moratalla, R., and Calabresi, P. (2003). Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *23*, 8506–8512.

Cepeda, C., and Levine, M.S. (2006). Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. *2006*, pe20.

Cepeda, C., Buchwald, N.A., and Levine, M.S. (1993). Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 9576–9580.

Cepeda, C., André, V.M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman-Weiner, M., and Levine, M.S. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. Eur. J. Neurosci. *27*, 671–682.

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

Cha, J.H., Frey, A.S., Alsdorf, S.A., Kerner, J.A., Kosinski, C.M., Mangiarini, L., Penney, J.B., Davies, S.W., Bates, G.P., and Young, A.B. (1999). Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *354*, 981–989.

Cha, J.-H.J., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P., and Young, A.B. (1998). Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 6480–6485.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature *410*, 37–40.

Chatterton, J.E., Awobuluyi, M., Premkumar, L.S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K.A., Nakanishi, N., et al. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. Nature *415*, 793–798.

Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R.R., and Sidhu, A. (2004). D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. J. Biol. Chem. *279*, 39317–39330.

Chen, J., Rusnak, M., Lombroso, P.J., and Sidhu, A. (2009). Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades. Eur. J. Neurosci. *29*, 287–306.

Chen, J.Y., Wang, E.A., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2013). Dopamine imbalance in Huntington's disease: a mechanism for the lack of behavioral flexibility. Front. Neurosci. *7*, 114.

Chen, N., Luo, T., Wellington, C., Metzler, M., McCutcheon, K., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (1999). Subtype-specific enhancement of NMDA receptor currents by mutant huntingtin. J. Neurochem. *72*, 1890–1898.

Chen, X., Zheng, X., Ding, K., Zhou, Z., Zhan, C.-G., and Zheng, F. (2017a). A quantitative LC-MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. J. Pharm. Biomed. Anal. *134*, 243–251.

Chen, Y., Wei, L.-N., and Müller, J.D. (2003). Probing protein oligomerization in living cells with fluorescence fluctuation spectroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 15492–15497.

Chen, Y., Zhen, W., Guo, T., Zhao, Y., Liu, A., Rubio, J.P., Krull, D., Richardson, J.C., Lu, H., and Wang, R. (2017b). Histamine Receptor 3 negatively regulates oligodendrocyte differentiation and remyelination. PloS One *12*, e0189380.

Chepkova, A., Yanovsky, E., Parmentier, R., Ohtsu, H., Haas, H.L., Lin, J.-S., and Sergeeva, O.A. (2012). Histamine receptor expression, hippocampal plasticity and ammonia in histidine decarboxylase knockout mice. Cell. Mol. Neurobiol. *32*, 17–25.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science *318*, 1258–1265.

Cherubini, M., and Ginés, S. (2017). Mitochondrial fragmentation in neuronal degeneration: Toward an understanding of HD striatal susceptibility. Biochem. Biophys. Res. Commun. *483*, 1063–1068.

Chiavegatto, S., Nasello, A.G., and Bernardi, M.M. (1998). Histamine and spontaneous motor activity: biphasic changes, receptors involved and participation of the striatal dopamine system. Life Sci. *62*, 1875–1888.

Christian, D.T., Wang, X., Chen, E.L., Sehgal, L.K., Ghassemlou, M.N., Miao, J.J., Estepanian, D., Araghi, C.H., Stutzmann, G.E., and Wolf, M.E. (2017). Dynamic Alterations of Rat Nucleus Accumbens Dendritic Spines over 2 Months of Abstinence from Extended-Access Cocaine Self-Administration. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *42*, 748–756.

Christopoulos, A., and Kenakin, T. (2002). G protein-coupled receptor allosterism and complexing. Pharmacol. Rev. *54*, 323–374.

Chung, H.J., Huang, Y.H., Lau, L.-F., and Huganir, R.L. (2004). Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 10248–10259.

Ciliax, B.J., Nash, N., Heilman, C., Sunahara, R., Hartney, A., Tiberi, M., Rye, D.B., Caron, M.G., Niznik, H.B., and Levey, A.I. (2000). Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. Synap. N. Y. N *37*, 125–145.

Ciruela, F., Canela, L., Burgueño, J., Soriguera, A., Cabello, N., Canela, E.I., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Woods, A.S., et al. (2005). Heptaspanning membrane receptors and cytoskeletal/scaffolding proteins: focus on adenosine, dopamine, and metabotropic glutamate receptor function. J. Mol. Neurosci. MN *26*, 277–292.

Cisbani, G., and Cicchetti, F. (2012). An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. Cell Death Dis. *3*, e382.

Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., et al. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. Nature *469*, 47–52.

Clabough, E.B.D. (2013). Huntington's Disease: The Past, Present, and Future Search for Disease Modifiers. Yale J. Biol. Med. *86*, 217–233.

Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. Prog. Neurobiol. *66*, 61–79.

Clarkson, R.L., Liptak, A.T., Gee, S.M., Sohal, V.S., and Bender, K.J. (2017). D3 Receptors Regulate Excitability in a Unique Class of Prefrontal Pyramidal Cells. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *37*, 5846–5860.

Cobos, E.J., Entrena, J.M., Nieto, F.R., Cendán, C.M., and Del Pozo, E. (2008). Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. Curr. Neuropharmacol. *6*, 344–366.

Cogé, F., Guénin, S.P., Audinot, V., Renouard-Try, A., Beauverger, P., Macia, C., Ouvry, C., Nagel, N., Rique, H., Boutin, J.A., et al. (2001). Genomic organization and characterization of splice variants of the human histamine H3 receptor. Biochem. J. *355*, 279–288.

Cohen-Armon, M., and Sokolovsky, M. (1993). Evidence for involvement of the voltage-dependent Na+ channel gating in depolarization-induced activation of G-proteins. J. Biol. Chem. *268*, 9824–9838.

Cohen-Matsliah, S.I., Brosh, I., Rosenblum, K., and Barkai, E. (2007). A novel role for extracellular signal-regulated kinase in maintaining long-term memory-relevant excitability changes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 12584–12589.

Conroy, J.L., Free, R.B., and Sibley, D.R. (2015). Identification of G protein-biased agonists that fail to recruit β-arrestin or promote internalization of the D1 dopamine receptor. ACS Chem. Neurosci. *6*, 681–692.

Cornil, C.A., and Ball, G.F. (2008). Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals. J. Comp. Neurol. *511*, 610–627.

Cortese, B.M., and Phan, K.L. (2005). The role of glutamate in anxiety and related disorders. CNS Spectr. *10*, 820–830.

Costa, T., and Herz, A. (1989). Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 7321–7325.

Creed, M., Kaufling, J., Fois, G.R., Jalabert, M., Yuan, T., Lüscher, C., Georges, F., and Bellone, C. (2016). Cocaine Exposure Enhances the Activity of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons via Calcium-Impermeable NMDARs. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *36*, 10759–10768.

Crimins, J.L., Pooler, A., Polydoro, M., Luebke, J.I., and Spires-Jones, T.L. (2013). The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. Ageing Res. Rev. *12*, 757–763.

Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., and Krainc, D. (2006). Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. Cell *127*, 59–69.

Dai, H., Fu, Q., Shen, Y., Hu, W., Zhang, Z., Timmerman, H., Leurs, R., and Chen, Z. (2007). The histamine H3 receptor antagonist clobenpropit enhances GABA release to protect against NMDA-induced excitotoxicity through the cAMP/protein kinase A pathway in cultured cortical neurons. Eur. J. Pharmacol. *563*, 117–123.

Dal Prà, I., Chiarini, A., Gui, L., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., Gardenal, E., Whitfield, J.F., and Armato, U. (2015). Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the "infectious" aβ and Tau drivers of Alzheimer's disease? Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry *21*, 9–29.

Dale, H.H., and Laidlaw, P.P. (1910). The physiological action of beta-iminazolylethylamine. J. Physiol. *41*, 318–344.

Dallérac, G.M., Vatsavayai, S.C., Cummings, D.M., Milnerwood, A.J., Peddie, C.J., Evans, K.A., Walters, S.W., Rezaie, P., Hirst, M.C., and Murphy, K.P.S.J. (2011). Impaired long-term potentiation in the prefrontal cortex of Huntington's disease mouse models: rescue by D1 dopamine receptor activation. Neurodegener. Dis. *8*, 230–239.

Dalley, J.W., and Everitt, B.J. (2009). Dopamine receptors in the learning, memory and drug reward circuitry. Semin. Cell Dev. Biol. *20*, 403–410.

Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., and Greenberg, M.E. (2000). EphB Receptors Interact with NMDA Receptors and Regulate Excitatory Synapse Formation. Cell *103*, 945–956.

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. Prog. Neurobiol. *65*, 1–105.

Daniels, D.J., Lenard, N.R., Etienne, C.L., Law, P.-Y., Roerig, S.C., and Portoghese, P.S. (2005). Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 19208–19213.

Danysz, W., and Parsons, C.G. (2012). Alzheimer's disease, β-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. Br. J. Pharmacol. *167*, 324–352.

Dau, A., Gladding, C.M., Sepers, M.D., and Raymond, L.A. (2014). Chronic blockade of extrasynaptic NMDA receptors ameliorates synaptic dysfunction and pro-death signaling in Huntington disease transgenic mice. Neurobiol. Dis. *62*, 533–542.

Daubner, S.C., Le, T., and Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Arch. Biochem. Biophys. *508*, 1–12.

Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2018). Nitric Oxide Signaling in Neurodegeneration and Cell Death. Adv. Pharmacol. San Diego Calif *82*, 57–83.

Dayalu, P., and Albin, R.L. (2015). Huntington disease: pathogenesis and treatment. Neurol. Clin. *33*, 101–114.

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

De Marco, M., and Venneri, A. (2018). Volume and Connectivity of the Ventral Tegmental Area are Linked to Neurocognitive Signatures of Alzheimer's Disease in Humans. J. Alzheimers Dis. JAD.

Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Fremeau, R.T., Bates, M.D., and Caron, M.G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. Nature *347*, 72–76.

Dechant, G., and Barde, Y.-A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. Nat. Neurosci. *5*, 1131–1136.

Deisseroth, K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. Nat. Neurosci. *18*, 1213–1225.

Deng, Y.P., Albin, R.L., Penney, J.B., Young, A.B., Anderson, K.D., and Reiner, A. (2004). Differential loss of striatal projection systems in Huntington's disease: a quantitative immunohistochemical study. J. Chem. Neuroanat. *27*, 143–164.

Deupi, X., and Kobilka, B.K. (2010). Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. Physiol. Bethesda Md *25*, 293–303.

Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 5274–5278.

Dickey, A.S., and La Spada, A.R. (2017). Therapy development in Huntington disease: From current strategies to emerging opportunities. Am. J. Med. Genet. A.

Ding, Y.-C., Chi, H.-C., Grady, D.L., Morishima, A., Kidd, J.R., Kidd, K.K., Flodman, P., Spence, M.A., Schuck, S., Swanson, J.M., et al. (2002). Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 309–314.

Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. Annu. Rev. Biochem. *60*, 653–688.

Dorsam, R.T., and Gutkind, J.S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. Nat. Rev. Cancer *7*, 79–94.

Dougherty, K.D., Dreyfus, C.F., and Black, I.B. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. Neurobiol. Dis. *7*, 574–585.

Drutel, G., Peitsaro, N., Karlstedt, K., Wieland, K., Smit, M.J., Timmerman, H., Panula, P., and Leurs, R. (2001). Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. Mol. Pharmacol. *59*, 1–8.

Dubach, M., Schmidt, R., Kunkel, D., Bowden, D.M., Martin, R., and German, D.C. (1987). Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: immunohistochemical evidence. Neurosci. Lett. *75*, 205–210.

Dungo, R., and Deeks, E.D. (2013). Istradefylline: first global approval. Drugs *73*, 875–882.

Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., and Joyner, A.L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. Science *269*, 407–410.

Edwards, T.M., and Rickard, N.S. (2007). New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. Neurosci. Biobehav. Rev. *31*, 413–425.

Eichel, K., Jullié, D., and von Zastrow, M. (2016). β-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. Nat. Cell Biol. *18*, 303–310.

Eisele, Y.S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S.A., Wolburg, H., Walker, L.C., Staufenbiel, M., Heikenwalder, M., and Jucker, M. (2010). Peripherally Applied Aβ-Containing Inoculates Induce Cerebral β-Amyloidosis. Science *330*, 980–982.

El Moustaine, D., Granier, S., Doumazane, E., Scholler, P., Rahmeh, R., Bron, P., Mouillac, B., Banères, J.-L., Rondard, P., and Pin, J.-P. (2012). Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 16342–16347.

Ellenbroek, B.A. (2013). Histamine H_3 receptors, the complex interaction with dopamine and its implications for addiction. Br. J. Pharmacol. *170*, 46–57.

Ellenbroek, B.A., and Ghiabi, B. (2014). The other side of the histamine H3 receptor. Trends Neurosci. *37*, 191–199.

Ellender, T.J., Huerta-Ocampo, I., Deisseroth, K., Capogna, M., and Bolam, J.P. (2011). Differential modulation of excitatory and inhibitory striatal synaptic transmission by histamine. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 15340–15351.

Epperly, T., Dunay, M.A., and Boice, J.L. (2017). Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. Am. Fam. Physician *95*, 771–778.

Ercan-Sencicek, A.G., Stillman, A.A., Ghosh, A.K., Bilguvar, K., O'Roak, B.J., Mason, C.E., Abbott, T., Gupta, A., King, R.A., Pauls, D.L., et al. (2010). L-histidine decarboxylase and Tourette's syndrome. N. Engl. J. Med. *362*, 1901–1908.

Eriksson, K.S., Sergeeva, O.A., Selbach, O., and Haas, H.L. (2004). Orexin (hypocretin)/dynorphin neurons control GABAergic inputs to tuberomammillary neurons. Eur. J. Neurosci. *19*, 1278–1284.

Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J.A., and Traynelis, S.F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. J. Physiol. *563*, 345–358.

Esbenshade, T.A., Strakhova, M.I., Carr, T.L., Sharma, R., Witte, D.G., Yao, B.B., Miller, T.R., and Hancock, A.A. (2006). Differential CNS expression and functional activity of multiple human H(3) receptor isoforms. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *55 Suppl 1*, S38-39.

Escartin, C., and Bonvento, G. (2008). Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. Mol. Neurobiol. *38*, 231–241.

Estrada-Sánchez, A.M., and Rebec, G.V. (2012). Corticostriatal dysfunction and glutamate transporter 1 (GLT1) in Huntington's disease: interactions between neurons and astrocytes. Basal Ganglia *2*, 57–66.

Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. Nat. Neurosci. *8*, 1481–1489.

Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2013). From the ventral to the dorsal striatum: devolving views of their roles in drug addiction. Neurosci. Biobehav. Rev. *37*, 1946–1954.

Fan, M.M.Y., and Raymond, L.A. (2007). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. Prog. Neurobiol. *81*, 272–293.

Fan, J., Gladding, C.M., Wang, L., Zhang, L.Y.J., Kaufman, A.M., Milnerwood, A.J., and Raymond, L.A. (2012). P38 MAPK is involved in enhanced NMDA receptor-dependent excitotoxicity in YAC transgenic mouse model of Huntington disease. Neurobiol. Dis. *45*, 999–1009.

Fang, M., Li, J., Tiu, S.C., Zhang, L., Wang, M., and Yew, D.T. (2005). N-methyl-D-aspartate receptor and apoptosis in Alzheimer's disease and multiinfarct dementia. J. Neurosci. Res. *81*, 269–274.

Farran, B. (2017). An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. Pharmacol. Res. *117*, 303–327.

Farré, D., Muñoz, A., Moreno, E., Reyes-Resina, I., Canet-Pons, J., Dopeso-Reyes, I.G., Rico, A.J., Lluís, C., Mallol, J., Navarro, G., et al. (2015). Stronger Dopamine D1 Receptor-Mediated Neurotransmission in Dyskinesia. Mol. Neurobiol. *52*, 1408–1420.

Faucard, R., Armand, V., Héron, A., Cochois, V., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2006). N-methyl-D-aspartate receptor antagonists enhance histamine neuron activity in rodent brain. J. Neurochem. *98*, 1487–1496.

Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2004). Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. Neuron *43*, 729–743.

Fernandez, T.V., Sanders, S.J., Yurkiewicz, I.R., Ercan-Sencicek, A.G., Kim, Y.-S., Fishman, D.O., Raubeson, M.J., Song, Y., Yasuno, K., Ho, W.S.C., et al. (2012). Rare copy number variants in tourette syndrome disrupt genes in histaminergic pathways and overlap with autism. Biol. Psychiatry *71*, 392–402.

Ferrada, C., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Justinova, Z., Barnes, C., Canela, E.I., Goldberg, S.R., Leurs, R., Lluis, C., et al. (2008). Interactions between histamine H3 and dopamine D2 receptors and the implications for striatal function. Neuropharmacology *55*, 190–197.

Ferrada, C., Moreno, E., Casadó, V., Bongers, G., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Leurs, R., Ferré, S., Lluís, C., et al. (2009). Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *157*, 64–75.

Ferraguti, F., and Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. Cell Tissue Res. *326*, 483–504.

Ferré, S., Popoli, P., Giménez-Llort, L., Rimondini, R., Müller, C.E., Strömberg, I., Ögren, S.O., and Fuxe, K. (2001). Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord. *7*, 235–241.

Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluis, C., and Franco, R. (2007). Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. Trends Neurosci. *30*, 440–446.

Ferré, S., Baler, R., Bouvier, M., Caron, M.G., Devi, L.A., Durroux, T., Fuxe, K., George, S.R., Javitch, J.A., Lohse, M.J., et al. (2009). Building a new conceptual framework for receptor heteromers. Nat. Chem. Biol. *5*, 131–134.

Ferré, S., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., and Franco, R. (2010a). G protein-coupled receptor heteromers as new targets for drug development. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. *91*, 41–52.

Ferré, S., Lluis, C., Lanciego, J.L., and Franco, R. (2010b). Prime time for G-protein-coupled receptor heteromers as therapeutic targets for CNS disorders: the dopamine D_1-D_3 receptor heteromer. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *9*, 596–600.

Ferré, S., Casadó, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J.-P., and Guitart, X. (2014). G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. Pharmacol. Rev. *66*, 413–434.

Ferré, S., Bonaventura, J., Tomasi, D., Navarro, G., Moreno, E., Cortés, A., Lluís, C., Casadó, V., and Volkow, N.D. (2016). Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramer. Neuropharmacology *104*, 154–160.

Ferreira, I.L., Ferreiro, E., Schmidt, J., Cardoso, J.M., Pereira, C.M.F., Carvalho, A.L., Oliveira, C.R., and Rego, A.C. (2015). Aβ and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. Neurobiol. Aging *36*, 680–692.

Fiorentini, C., Gardoni, F., Spano, P., Di Luca, M., and Missale, C. (2003). Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors. J. Biol. Chem. *278*, 20196–20202.

Fiorentini, C., Busi, C., Gorruso, E., Gotti, C., Spano, P., and Missale, C. (2008). Reciprocal regulation of dopamine D1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. Mol. Pharmacol. *74*, 59–69.

Flik, G., Folgering, J.H.A., Cremers, T.I.H.F., Westerink, B.H.C., and Dremencov, E. (2015). Interaction Between Brain Histamine and Serotonin, Norepinephrine, and Dopamine Systems: In Vivo Microdialysis and Electrophysiology Study. J. Mol. Neurosci. MN *56*, 320–328.

Flock, T., Ravarani, C.N.J., Sun, D., Venkatakrishnan, A.J., Kayikci, M., Tate, C.G., Veprintsev, D.B., and Babu, M.M. (2015). Universal allosteric mechanism for Gα activation by GPCRs. Nature *524*, 173–179.

Flores-Hernández, J., Cepeda, C., Hernández-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P., and Levine, M.S. (2002). Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. J. Neurophysiol. *88*, 3010–3020.

Flores-Soto, M.E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R.E., and Beas-Zarate, C. (2012). [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. Neurol. Barc. Spain *27*, 301–310.

Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem. *42*, 1–11.

Ford, C.P. (2014). The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. Neuroscience *282*, 13–22.

Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Ann. Phys. *437*, 55–75.

Foster, S.R., and Bräuner-Osborne, H. (2017). Investigating Internalization and Intracellular Trafficking of GPCRs: New Techniques and Real-Time Experimental Approaches. Handb. Exp. Pharmacol.

Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., and Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. Nature *421*, 127–128.

Franco, R., and Cedazo-Minguez, A. (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? Front. Pharmacol. *5*, 146.

Franco, R., Canals, M., Marcellino, D., Ferré, S., Agnati, L., Mallol, J., Casadó, V., Ciruela, F., Fuxe, K., Lluis, C., et al. (2003). Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. Trends Biochem. Sci. *28*, 238–243.

Fraser, C.M., Chung, F.Z., Wang, C.D., and Venter, J.C. (1988). Site-directed mutagenesis of human beta-adrenergic receptors: substitution of aspartic acid-130 by asparagine produces a receptor with high-affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 5478–5482.

Frederick, A.L., Yano, H., Trifilieff, P., Vishwasrao, H.D., Biezonski, D., Mészáros, J., Urizar, E., Sibley, D.R., Kellendonk, C., Sonntag, K.C., et al. (2015). Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers. Mol. Psychiatry.

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

Free, R.B., Hazelwood, L.A., Cabrera, D.M., Spalding, H.N., Namkung, Y., Rankin, M.L., and Sibley, D.R. (2007). D1 and D2 dopamine receptor expression is regulated by direct interaction with the chaperone protein calnexin. J. Biol. Chem. *282*, 21285–21300.

Frerking, M., Schmitz, D., Zhou, Q., Johansen, J., and Nicoll, R.A. (2001). Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *21*, 2958–2966.

Fu, Q., Dai, H., He, P., Hu, W., Fan, Y., Zhang, W., and Chen, Z. (2010). The H3 receptor antagonist clobenpropit protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells. Pharm. *65*, 257–260.

Fusco, F.R., Chen, Q., Lamoreaux, W.J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J.A., Surmeier, D.J., Honig, M.G., Carlock, L.R., and Reiner, A. (1999). Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *19*, 1189–1202.

Fuxe, K., Agnati, L.F., Benfenati, F., Celani, M., Zini, I., Zoli, M., and Mutt, V. (1983). Evidence for the existence of receptor--receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. J. Neural Transm. Suppl. *18*, 165–179.

Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M., and Agnati, L.F. (1998). Integrated events in central dopamine transmission as analyzed 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. *26*, 258–273.

Fuxe, K., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D.O., Guescini, M., Fernández-Dueñas, V., Tanganelli, S., Rivera, A., Ciruela, F., and Agnati, L.F. (2010). Adenosine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. CNS Neurosci. Ther. *16*, e18-42.

Galés, C., Van Durm, J.J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. Nat. Struct. Mol. Biol. *13*, 778–786.

Galimberti, D., Ghezzi, L., and Scarpini, E. (2013). Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease. J. Neurol. Sci. *333*, 50–54.

Galvan, A., Hu, X., Rommelfanger, K.S., Pare, J.-F., Khan, Z.U., Smith, Y., and Wichmann, T. (2014). Localization and function of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of normal and parkinsonian monkeys. J. Neurophysiol. *112*, 467–479.

Galvan, L., André, V.M., Wang, E.A., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2012). Functional Differences Between Direct and Indirect Striatal Output Pathways in Huntington's Disease. J. Huntingt. Dis. *1*, 17–25.

García-Gálvez, A.M., and Arias-Montaño, J.A. (2016). [Isoforms of the human histamine H3 receptor: Generation, expression in the central nervous system and functional implications]. Gac. Med. Mex. *152*, 94–102.

Gbahou, F., Rouleau, A., and Arrang, J.-M. (2012). The histamine autoreceptor is a short isoform of the H_3 receptor. Br. J. Pharmacol. *166*, 1860–1871.

Geiger, J.R., Melcher, T., Koh, D.S., Sakmann, B., Seeburg, P.H., Jonas, P., and Monyer, H. (1995). Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca2+ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. Neuron *15*, 193–204.

George, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G., and O'Dowd, B.F. (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. J. Biol. Chem. *275*, 26128–26135.

George, S.R., Kern, A., Smith, R.G., and Franco, R. (2014). Dopamine receptor heteromeric complexes and their emerging functions. Prog. Brain Res. *211*, 183–200.

Gerfen, C.R. (1984). The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. Nature *311*, 461–464.

Gerfen, C.R., and Surmeier, D.J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. Annu. Rev. Neurosci. *34*, 441–466.

German, D.C., and Manaye, K.F. (1993). Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. J. Comp. Neurol. *331*, 297–309.

Gertler, T.S., Chan, C.S., and Surmeier, D.J. (2008). Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 10814–10824.

Gesty-Palmer, D., Chen, M., Reiter, E., Ahn, S., Nelson, C.D., Wang, S., Eckhardt, A.E., Cowan, C.L., Spurney, R.F., Luttrell, L.M., et al. (2006). Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation. J. Biol. Chem. *281*, 10856–10864.

GhandForoushan, M., Zendehdel, M., and Babpour, V. (2017). Interactions between Histamine H1 and H3 and Dopamine D1 Receptors on feeding behavior in chicken. Iran. J. Vet. Med. *11*, 63–73.

Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W., and Paoletti, P. (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. Nature *459*, 703–707.

Gildea, J.J., Shah, I.T., Van Sciver, R., Israel, J.A., Enzensperger, C., McGrath, H.E., Jose, P.A., and Felder, R.A. (2014). The cooperative roles of the dopamine receptors, D1R and D5R, on the regulation of renal sodium transport. Kidney Int. *86*, 118–126.

Giménez-Xavier, P., Gómez-Santos, C., Castaño, E., Francisco, R., Boada, J., Unzeta, M., Sanz, E., and Ambrosio, S. (2006). The decrease of NAD(P)H has a prominent role in dopamine toxicity. Biochim. Biophys. Acta *1762*, 564–574.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000a). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 8606–8611.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E.I., Rondin, S., Lew, J.Y., Watson, S., Zoli, M., et al. (2000b). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 8606–8611.

Gingrich, J.A., and Caron, M.G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. Annu. Rev. Neurosci. *16*, 299–321.

Giralt, A., Friedman, H.C., Caneda-Ferrón, B., Urbán, N., Moreno, E., Rubio, N., Blanco, J., Peterson, A., Canals, J.M., and Alberch, J. (2010). BDNF regulation under GFAP promoter provides engineered astrocytes as a new approach for long-term protection in Huntington's disease. Gene Ther. *17*, 1294–1308.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., and Caron, M.G. (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature *379*, 606–612.

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

Goebel-Goody, S.M., Davies, K.D., Alvestad Linger, R.M., Freund, R.K., and Browning, M.D. (2009). Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices. Neuroscience *158*, 1446–1459.

Goedert, M. (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβ, tau, and α-synuclein. Science *349*, 1255555.

Goldman-Rakic, P.S., Muly, E.C., and Williams, G.V. (2000). D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. Brain Res. Brain Res. Rev. *31*, 295–301.

Goldsmith, Z.G., and Dhanasekaran, D.N. (2007). G protein regulation of MAPK networks. Oncogene *26*, 3122–3142.

Goldstein, R.A., DesLauriers, C., and Burda, A.M. (2009). Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review. Dis.--Mon. DM *55*, 6–38.

Gomes, I., Gupta, A., and Devi, L.A. (2013). G-protein-coupled heteromers: regulation in disease. Methods Enzymol. *521*, 219–238.

Gomes, I., Ayoub, M.A., Fujita, W., Jaeger, W.C., Pfleger, K.D.G., and Devi, L.A. (2016). G Protein-Coupled Receptor Heteromers. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *56*, 403–425.

Gomez-Ramirez, J., Johnston, T.H., Visanji, N.P., Fox, S.H., and Brotchie, J.M. (2006). Histamine H3 receptor agonists reduce L-dopa-induced chorea, but not dystonia, in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc. *21*, 839–846.

González-Sepúlveda, M., Rosell, S., Hoffmann, H.M., Castillo-Ruiz, M. del M., Mignon, V., Moreno-Delgado, D., Vignes, M., Díaz, J., Sabriá, J., and Ortiz, J. (2013). Cellular distribution of the histamine H3 receptor in the basal ganglia: Functional modulation of dopamine and glutamate neurotransmission. Basal Ganglia *3*, 109–121.

Goodchild, R.E., Court, J.A., Hobson, I., Piggott, M.A., Perry, R.H., Ince, P., Jaros, E., and Perry, E.K. (1999). Distribution of histamine H3-receptor binding in the normal human basal ganglia: comparison with Huntington's and Parkinson's disease cases. Eur. J. Neurosci. *11*, 449–456.

Gorwood, P., Le Strat, Y., Ramoz, N., Dubertret, C., Moalic, J.-M., and Simonneau, M. (2012). Genetics of dopamine receptors and drug addiction. Hum. Genet. *131*, 803–822.

Grace, A.A., Floresco, S.B., Goto, Y., and Lodge, D.J. (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. Trends Neurosci. *30*, 220–227.

Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., and Büldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. Nature *391*, 918–921.

Graveland, G.A., and DiFiglia, M. (1985). The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. Brain Res. *327*, 307–311.

Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., and Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. Science *265*, 1826–1831.

Greengard, P. (2001). The neurobiology of slow synaptic transmission. Science *294*, 1024–1030.

Greengard, P., Allen, P.B., and Nairn, A.C. (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. Neuron *23*, 435–447.

Grima, J.C., Daigle, J.G., Arbez, N., Cunningham, K.C., Zhang, K., Ochaba, J., Geater, C., Morozko, E., Stocksdale, J., Glatzer, J.C., et al. (2017). Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex. Neuron *94*, 93-107.e6.

Grove, R.A., Harrington, C.M., Mahler, A., Beresford, I., Maruff, P., Lowy, M.T., Nicholls, A.P., Boardley, R.L., Berges, A.C., Nathan, P.J., et al. (2014). A randomized, double-blind, placebo-controlled, 16-week study of the H3 receptor antagonist, GSK239512 as a monotherapy in subjects with mild-to-moderate Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *11*, 47–58.

Grundmann, M., and Kostenis, E. (2017). Temporal Bias: Time-Encoded Dynamic GPCR Signaling. Trends Pharmacol. Sci. *38*, 1110–1124.

Gubitz, A.K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K.A., and Richardson, P.J. (1996). Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. J. Neurochem. *67*, 374–381.

Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., and Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. Neurol. Barc. Spain *30*, 119–129.

Guitart, X., Navarro, G., Moreno, E., Yano, H., Cai, N.-S., Sánchez-Soto, M., Kumar-Barodia, S., Naidu, Y.T., Mallol, J., Cortés, A., et al. (2014). Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. Mol. Pharmacol. *86*, 417–429.

Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 17495–17500.

Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. EMBO J. *27*, 2293–2304.

Gurden, H., Takita, M., and Jay, T.M. (2000). Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *20*, RC106.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. Pharmacol. Ther. *110*, 465–502.

Gurevich, V.V., and Gurevich, E.V. (2017). Molecular Mechanisms of GPCR Signaling: A Structural Perspective. Int. J. Mol. Sci. *18*.

Gusella, J.F., MacDonald, M.E., and Lee, J.-M. (2014). Genetic modifiers of Huntington's disease. Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc. *29*, 1359–1365.

Haas, H., and Panula, P. (2003). The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 121–130.

Haas, H.L., Sergeeva, O.A., and Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. Physiol. Rev. *88*, 1183–1241.

Hackos, D.H., and Hanson, J.E. (2017). Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences. Neuropharmacology *112*, 34–45.

Hagenow, J., and Stark, H. (2015). Histamine H_4 Receptor Antagonists: A New Approach for Tinnitus Treatment? Recent Patents CNS Drug Discov. *10*, 6–9.

Halt, A.R., Dallapiazza, R.F., Zhou, Y., Stein, I.S., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A.J., and Hell, J.W. (2012). CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. EMBO J. *31*, 1203–1216.

Han, I., You, Y., Kordower, J.H., Brady, S.T., and Morfini, G.A. (2010). Differential vulnerability of neurons in Huntington's disease: the role of cell type-specific features. J. Neurochem. *113*, 1073–1091.

Han, Y., Moreira, I.S., Urizar, E., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2009). Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. Nat. Chem. Biol. *5*, 688–695.

Hancock, A.A., Esbenshade, T.A., Krueger, K.M., and Yao, B.B. (2003). Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. Life Sci. *73*, 3043–3072.

Hänselmann, S., and Herten, D.-P. (2017). Two-Color Single-Molecule Tracking in Live Cells. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1663*, 127–138.

Hansen, K.B., Mullasseril, P., Dawit, S., Kurtkaya, N.L., Yuan, H., Vance, K.M., Orr, A.G., Kvist, T., Ogden, K.K., Le, P., et al. (2010a). Implementation of a fluorescence-based screening assay identifies histamine H3 receptor antagonists clobenpropit and iodophenpropit as subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. J. Pharmacol. Exp. Ther. *333*, 650–662.

Hansen, K.B., Furukawa, H., and Traynelis, S.F. (2010b). Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. Mol. Pharmacol. *78*, 535–549.

Hanson, M.A., Roth, C.B., Jo, E., Griffith, M.T., Scott, F.L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S.M., Schuerer, S.C., et al. (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. Science *335*, 851–855.

Hantraye, P. (1998). Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. Nucl. Med. Biol. *25*, 721–728.

Hardingham, G.E., and Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. Trends Neurosci. *26*, 81–89.

Hardingham, G.E., and Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. Nat. Rev. Neurosci. *11*, 682–696.

Hardy John (2009). The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal. J. Neurochem. *110*, 1129–1134.

Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Fong, S.L., Rao, J.K., and Argos, P. (1983). The structure of bovine rhodopsin. Biophys. Struct. Mech. *9*, 235–244.

Hashimoto, K. (2013). Sigma-1 receptor chaperone and brain-derived neurotrophic factor: emerging links between cardiovascular disease and depression. Prog. Neurobiol. *100*, 15–29.

Hassel, B., Tessler, S., Faull, R.L.M., and Emson, P.C. (2008). Glutamate uptake is reduced in prefrontal cortex in Huntington's disease. Neurochem. Res. *33*, 232–237.

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. Nat. Rev. Drug Discov. *16*, 829–842.

Hawkins, L.M., Prybylowski, K., Chang, K., Moussan, C., Stephenson, F.A., and Wenthold, R.J. (2004). Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-d-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. J. Biol. Chem. *279*, 28903–28910.

Hayashi, T., and Su, T. (2005a). The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. Curr. Neuropharmacol. *3*, 267–280.

Hayashi, T., and Su, T.P. (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 491–496.

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2003). Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. J. Pharmacol. Exp. Ther. *306*, 718–725.

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2005b). The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. Life Sci. *77*, 1612–1624.

Hayashi, T., and Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. Cell *131*, 596–610.

He, S.-Q., Zhang, Z.-N., Guan, J.-S., Liu, H.-R., Zhao, B., Wang, H.-B., Li, Q., Yang, H., Luo, J., Li, Z.-Y., et al. (2011). Facilitation of μ-opioid receptor activity by preventing δ-opioid receptor-mediated codegradation. Neuron *69*, 120–131.

Heal, D.J., Gosden, J., and Smith, S.L. (2014). Dopamine reuptake transporter (DAT) "inverse agonism"--a novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. Neuropharmacology *87*, 19–40.

Heller, E.A., Cates, H.M., Peña, C.J., Sun, H., Shao, N., Feng, J., Golden, S.A., Herman, J.P., Walsh, J.J., Mazei-Robison, M., et al. (2014). Locus-specific epigenetic remodeling controls addiction- and depression-related behaviors. Nat. Neurosci. *17*, 1720–1727.

Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J.E., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. Lancet Neurol. *14*, 388–405.

Heng, M.Y., Detloff, P.J., Wang, P.L., Tsien, J.Z., and Albin, R.L. (2009). In vivo evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 3200–3205.

Hern, J.A., Baig, A.H., Mashanov, G.I., Birdsall, B., Corrie, J.E.T., Lazareno, S., Molloy, J.E., and Birdsall, N.J.M. (2010). Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 2693–2698.

Herrero, M.-T., Barcia, C., and Navarro, J.M. (2002). Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg. *18*, 386–404.

Hersi, A.I., Kitaichi, K., Srivastava, L.K., Gaudreau, P., and Quirion, R. (2000). Dopamine D-5 receptor modulates hippocampal acetylcholine release. Brain Res. Mol. Brain Res. *76*, 336–340.

Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C., Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, R., and Haas, H.L. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. Pharmacol. Rev. *49*, 253–278.

Hiller, C., Kühhorn, J., and Gmeiner, P. (2013). Class A G-protein-coupled receptor (GPCR) dimers and bivalent ligands. J. Med. Chem. *56*, 6542–6559.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M.E., Mallol, J., et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. J. Biol. Chem. *277*, 18091–18097.

Hiranita, T., Mereu, M., Soto, P.L., Tanda, G., and Katz, J.L. (2013). Self-administration of cocaine induces dopamine-independent self-administration of sigma agonists. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *38*, 605–615.

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

Hnasko, T.S., Sotak, B.N., and Palmiter, R.D. (2007). Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 12484–12488.

Hodges, A., Strand, A.D., Aragaki, A.K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L.A., Hartog, C., Goldstein, D.R., Thu, D., et al. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. Hum. Mol. Genet. *15*, 965–977.

Hoffner, G., and Djian, P. (2015). Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? Mol. Neurobiol. *52*, 1297–1314.

Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.-W., Park, J.H., Heck, M., and Ernst, O.P. (2009). A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. Trends Biochem. Sci. *34*, 540–552.

Hong, W.C., Yano, H., Hiranita, T., Chin, F.T., McCurdy, C.R., Su, T.-P., Amara, S.G., and Katz, J.L. (2017). The sigma-1 receptor modulates dopamine transporter conformation and cocaine binding and may thereby potentiate cocaine self-administration in rats. J. Biol. Chem. *292*, 11250–11261.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. Neuron *68*, 1067–1081.

Hopf, F.W. (2017). Do specific NMDA receptor subunits act as gateways for addictive behaviors? Genes Brain Behav. *16*, 118–138.

Horak, M., and Wenthold, R.J. (2009). Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. J. Biol. Chem. *284*, 9683–9691.

Hotte, M., Thuault, S., Lachaise, F., Dineley, K.T., Hemmings, H.C., Nairn, A.C., and Jay, T.M. (2006). D1 receptor modulation of memory retrieval performance is associated with changes in pCREB and pDARPP-32 in rat prefrontal cortex. Behav. Brain Res. *171*, 127–133.

Hu, W., and Chen, Z. (2017). The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. Pharmacol. Ther. *175*, 116–132.

Hu, C.-D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. Mol. Cell *9*, 789–798.

Hu, J., Thor, D., Zhou, Y., Liu, T., Wang, Y., McMillin, S.M., Mistry, R., Challiss, R.A.J., Costanzi, S., and Wess, J. (2012a). Structural aspects of M3 muscarinic acetylcholine receptor dimer formation and activation. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *26*, 604–616.

Hu, N.-W., Ondrejcak, T., and Rowan, M.J. (2012b). Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: update on recent advances. Pharmacol. Biochem. Behav. *100*, 855–862.

Hu, R., Wei, P., Jin, L., Zheng, T., Chen, W.-Y., Liu, X.-Y., Shi, X.-D., Hao, J.-R., Sun, N., and Gao, C. (2017). Overexpression of EphB2 in hippocampus rescues impaired NMDA receptors trafficking and cognitive dysfunction in Alzheimer model. Cell Death Dis. *8*, e2717.

Hu, W.-W., Fang, Q., Xu, Z.-H., Yan, H.-J., He, P., Zhong, K., Fan, Y.-Y., Yang, Y., Zhang, X.-N., Zhang, C.-Y., et al. (2012c). Chronic h1-antihistamine treatment increases seizure susceptibility after withdrawal by impairing glutamine synthetase. CNS Neurosci. Ther. *18*, 683–690.

Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2013). Crystal structure of oligomeric β1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. Nat. Struct. Mol. Biol. *20*, 419–425.

van Huijstee, A.N., and Mansvelder, H.D. (2014). Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. Front. Cell. Neurosci. *8*, 466.

Humbert-Claude, M., Morisset, S., Gbahou, F., and Arrang, J.-M. (2007). Histamine H3 and dopamine D2 receptor-mediated [35S]GTPgamma[S] binding in rat striatum: evidence for additive effects but lack of interactions. Biochem. Pharmacol. *73*, 1172–1181.

Hunt, D.L., and Castillo, P.E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. Curr. Opin. Neurobiol. *22*, 496–508.

Huntington, G. On chorea. *Med. Surg. Rep.* **26**, 320–321 (1872).

Hussain, N., Flumerfelt, B.A., and Rajakumar, N. (2002). Muscarinic, adenosine A(2) and histamine H(3) receptor modulation of haloperidol-induced c-fos expression in the striatum and nucleus accumbens. Neuroscience *112*, 427–438.

Ibrahim, M.Z. (1974). The mast cells of the mammalian central nervous system. 2. The effect of proton irradiation in the monkey. J. Neurol. Sci. *21*, 479–499.

Ikeda, S.R., and Dunlap, K. (1999). Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels: role of G protein subunits. Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res. *33*, 131–151.

Ikemoto, K., Satoh, K., Kitahama, K., and Maeda, T. (1996). Demonstration of a new dopamine-containing cell group in the primate rostral telencephalon. Neurosci. Lett. *220*, 69–71.

Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W., and Südhof, T.C. (1997). Binding of neuroligins to PSD-95. Science *277*, 1511–1515.

Iversen, S.D., and Iversen, L.L. (2007). Dopamine: 50 years in perspective. Trends Neurosci. *30*, 188–193.

J Gingell, J., Simms, J., Barwell, J., Poyner, D.R., Watkins, H.A., Pioszak, A.A., Sexton, P.M., and Hay, D.L. (2016). An allosteric role for receptor activity-modifying proteins in defining GPCR pharmacology. Cell Discov. *2*, 16012.

Jackson, D.M., and Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. Pharmacol. Ther. *64*, 291–370.

Jakel, R.J., and Maragos, W.F. (2000). Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. Trends Neurosci. *23*, 239–245.

Janetopoulos, C., Jin, T., and Devreotes, P. (2001). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells. Science *291*, 2408–2411.

Jarrahian, A., Watts, V.J., and Barker, E.L. (2004). D2 dopamine receptors modulate Galpha-subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor. J. Pharmacol. Exp. Ther. *308*, 880–886.

Jatzke, C., Watanabe, J., and Wollmuth, L.P. (2002). Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. J. Physiol. *538*, 25–39.

Jaworski, J.N., Kozel, M.A., Philpot, K.B., and Kuhar, M.J. (2003). Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity. J. Pharmacol. Exp. Ther. *307*, 1038–1044.

Jaworski, J.N., Hansen, S.T., Kuhar, M.J., and Mark, G.P. (2008). Injection of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide into the nucleus accumbens reduces cocaine self-administration in rats. Behav. Brain Res. *191*, 266–271.

Jay, T.M. (2003). Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. Prog. Neurobiol. *69*, 375–390.

Jazayeri, A., Doré, A.S., Lamb, D., Krishnamurthy, H., Southall, S.M., Baig, A.H., Bortolato, A., Koglin, M., Robertson, N.J., Errey, J.C., et al. (2016). Extra-helical binding site of a glucagon receptor antagonist. Nature *533*, 274–277.

Jean, B., Surratt, C.K., and Madura, J.D. (2017). Molecular dynamics of conformation-specific dopamine transporter-inhibitor complexes. J. Mol. Graph. Model. *76*, 143–151.

Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S., and Shenoy, S.K. (2017). G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β-Arrestin-Dependent Mechanisms. J. Cardiovasc. Pharmacol. *70*, 142–158.

Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Wang, Y., and Birnbaumer, L. (2001). Most central nervous system D2 dopamine receptors are coupled to their effectors by Go. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3577–3582.

Job, M.O., Shen, L.L., and Kuhar, M.J. (2013). The inhibition of cocaine-induced locomotor activity by CART 55-102 is lost after repeated cocaine administration. Neurosci. Lett. *550*, 179–183.

Jocoy, E.L., André, V.M., Cummings, D.M., Rao, S.P., Wu, N., Ramsey, A.J., Caron, M.G., Cepeda, C., and Levine, M.S. (2011). Dissecting the contribution of individual receptor subunits to the enhancement of N-methyl-d-aspartate currents by dopamine D1 receptor activation in striatum. Front. Syst. Neurosci. *5*, 28.

Joffe, M.E., Grueter, C.A., and Grueter, B.A. (2014). Biological substrates of addiction. Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci. *5*, 151–171.

Johnston, J.M., Wang, H., Provasi, D., and Filizola, M. (2012). Assessing the relative stability of dimer interfaces in g protein-coupled receptors. PLoS Comput. Biol. *8*, e1002649.

Johri, A., Chandra, A., and Beal, M.F. (2013). PGC-1α, mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. Free Radic. Biol. Med. *62*, 37–46.

Jonas, K.C., and Hanyaloglu, A.C. (2017). Impact of G protein-coupled receptor heteromers in endocrine systems. Mol. Cell. Endocrinol. *449*, 21–27.

Jones, B.W., Song, G.J., Greuber, E.K., and Hinkle, P.M. (2007). Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. J. Biol. Chem. *282*, 12893–12906.

Jong, Y.-J.I., Harmon, S.K., and O'Malley, K.L. (2017). GPCR signalling from within the cell. Br. J. Pharmacol.

Jørgensen, E.A., Knigge, U., Warberg, J., and Kjaer, A. (2007). Histamine and the regulation of body weight. Neuroendocrinology *86*, 210–214.

Josefsson, L.G. (1999). Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. Gene *239*, 333–340.

Joseph, J.D., Wang, Y.-M., Miles, P.R., Budygin, E.A., Picetti, R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., and Wightman, R.M. (2002). Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. Neuroscience *112*, 39–49.

Kara, E., Crépieux, P., Gauthier, C., Martinat, N., Piketty, V., Guillou, F., and Reiter, E. (2006). A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *20*, 3014–3026.

Karagiannidis, I., Dehning, S., Sandor, P., Tarnok, Z., Rizzo, R., Wolanczyk, T., Madruga-Garrido, M., Hebebrand, J., Nöthen, M.M., Lehmkuhl, G., et al. (2013). Support of the histaminergic hypothesis in Tourette syndrome: association of the histamine decarboxylase gene in a large sample of families. J. Med. Genet. *50*, 760–764.

Karakas, E., and Furukawa, H. (2014). Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. Science *344*, 992–997.

Karch, C.M., and Goate, A.M. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. Biol. Psychiatry *77*, 43–51.

Karpa, K.D., Lin, R., Kabbani, N., and Levenson, R. (2000). The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D3 splice variant d3nf: D3-D3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. Mol. Pharmacol. *58*, 677–683.

Karpova, A., Mikhaylova, M., Bera, S., Bär, J., Reddy, P.P., Behnisch, T., Rankovic, V., Spilker, C., Bethge, P., Sahin, J., et al. (2013). Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. Cell *152*, 1119–1133.

Kasai, R.S., Suzuki, K.G.N., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. J. Cell Biol. *192*, 463–480.

Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T., and Kang, Y. (1995). Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. Cell *81*, 245–252.

Kassubek, J., Juengling, F.D., Kioschies, T., Henkel, K., Karitzky, J., Kramer, B., Ecker, D., Andrich, J., Saft, C., Kraus, P., et al. (2004). Topography of cerebral atrophy in early Huntington's disease: a voxel based morphometric MRI study. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *75*, 213–220.

Katz, J.L., Hiranita, T., Hong, W.C., Job, M.O., and McCurdy, C.R. (2016). A Role for Sigma Receptors in Stimulant Self-Administration and Addiction. In Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors, (Springer, Cham), pp. 177–218.

Kebabian, J.W., and Calne, D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. Nature *277*, 93–96.

Kebabian, J.W., and Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenyl cyclase: possible role in synaptic transmission. Science *174*, 1346–1349.

Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.-H., Chen, J.D., et al. (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. J. Biol. Chem. *277*, 7466–7476.

Kegel, K.B., Sapp, E., Yoder, J., Cuiffo, B., Sobin, L., Kim, Y.J., Qin, Z.-H., Hayden, M.R., Aronin, N., Scott, D.L., et al. (2005). Huntingtin associates with acidic phospholipids at the plasma membrane. J. Biol. Chem. *280*, 36464–36473.

Kehoe, L.A., Bernardinelli, Y., and Muller, D. (2013). GluN3A: an NMDA receptor subunit with exquisite properties and functions. Neural Plast. *2013*, 145387.

Kenakin, T. (2005). The physiological significance of constitutive receptor activity. Trends Pharmacol. Sci. *26*, 603–605.

Kenakin, T.P. (2009). '7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins. Trends Pharmacol. Sci. *30*, 460–469.

Kenakin, T., and Miller, L.J. (2010). Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. Pharmacol. Rev. *62*, 265–304.

Kenakin, T., Agnati, L.F., Caron, M., Fredholm, B., Guidoli, D., Kobilka, B., Lefkowitz, R.W., Lohse, M., Woods, A., and Fuxe, K. (2010). International Workshop at the Nobel Forum, Karolinska Institutet on G protein-coupled receptors: finding the words to describe monomers, oligomers, and their molecular mechanisms and defining their meaning. Can a consensus be reached? J. Recept. Signal Transduct. Res. *30*, 284–286.

Kent, T., McAlpine, C., Sabetnia, S., and Presland, J. (2007). G-protein-coupled receptor heterodimerization: assay technologies to clinical significance. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. *10*, 580–589.

Kew, J.N.C., and Kemp, J.A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacology (Berl.) *179*, 4–29.

Khan, M.Z. (2017). Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) of the delta family (GluD1 and GluD2) and synaptogenesis. Alex. J. Med. *53*, 201–206.

Khoury, E., Clément, S., and Laporte, S.A. (2014). Allosteric and biased g protein-coupled receptor signaling regulation: potentials for new therapeutics. Front. Endocrinol. *5*, 68.

Kidd, K.K., Pakstis, A.J., and Yun, L. (2014). An historical perspective on "The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus." Hum. Genet. *133*, 431–433.

Kim, F.J. (2017). Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. Handb. Exp. Pharmacol. *244*, 1–11.

Kim, C.K., Adhikari, A., and Deisseroth, K. (2017). Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience. Nat. Rev. Neurosci. *18*, 222–235.

Kim, H.-W., Roh, D.-H., Yoon, S.-Y., Seo, H.-S., Kwon, Y.-B., Han, H.-J., Kim, K.-W., Beitz, A.J., and Lee, J.-H. (2008). Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. Br. J. Pharmacol. *154*, 1125–1134.

Kimple, A.J., Bosch, D.E., Giguère, P.M., and Siderovski, D.P. (2011). Regulators of G-protein signaling and their Gα substrates: promises and challenges in their use as drug discovery targets. Pharmacol. Rev. *63*, 728–749.

Kimura, K., White, B.H., and Sidhu, A. (1995). Coupling of human D-1 dopamine receptors to different guanine nucleotide binding proteins. Evidence that D-1 dopamine receptors can couple to both Gs and G(o). J. Biol. Chem. *270*, 14672–14678.

King, N., Hittinger, C.T., and Carroll, S.B. (2003). Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. Science *301*, 361–363.

Klein, P.S., Sun, T.J., Saxe, C.L., Kimmel, A.R., Johnson, R.L., and Devreotes, P.N. (1988). A chemoattractant receptor controls development in Dictyostelium discoideum. Science *241*, 1467–1472.

Koh, J.Y., Yang, L.L., and Cotman, C.W. (1990). Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. Brain Res. *533*, 315–320.

Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. Mol. Pharmacol. *63*, 9–18.

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

Kolberg, K., Puettmann, C., Pardo, A., Fitting, J., and Barth, S. (2013). SNAP-tag technology: a general introduction. Curr. Pharm. Des. *19*, 5406–5413.

Komater, V.A., Buckley, M.J., Browman, K.E., Pan, J.B., Hancock, A.A., Decker, M.W., and Fox, G.B. (2005). Effects of histamine H3 receptor antagonists in two models of spatial learning. Behav. Brain Res. *159*, 295–300.

Kong, M.M.C., Fan, T., Varghese, G., O'dowd, B.F., and George, S.R. (2006). Agonist-induced cell surface trafficking of an intracellularly sequestered D1 dopamine receptor homo-oligomer. Mol. Pharmacol. *70*, 78–89.

Koob, G.F., and Volkow, N.D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. Lancet Psychiatry *3*, 760–773.

Kopeikina, K.J., Hyman, B.T., and Spires-Jones, T.L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. Transl. Neurosci. *3*, 223–233.

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. Science *269*, 1737–1740.

Kosten, T.R., and Domingo, C.B. (2013). Can you vaccinate against substance abuse? Expert Opin. Biol. Ther. *13*, 1093–1097.

Kotowski, S.J., Hopf, F.W., Seif, T., Bonci, A., and von Zastrow, M. (2011). Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. Neuron *71*, 278–290.

Kourrich, S., Hayashi, T., Chuang, J.-Y., Tsai, S.-Y., Su, T.-P., and Bonci, A. (2013). Dynamic interaction between sigma-1 receptor and Kv1.2 shapes neuronal and behavioral responses to cocaine. Cell *152*, 236–247.

Kreitzer, A.C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. Annu. Rev. Neurosci. *32*, 127–147.

Kreutz, M.R., Böckers, T.M., Bockmann, J., Seidenbecher, C.I., Kracht, B., Vorwerk, C.K., Weise, J., and Sabel, B.A. (1998). Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *18*, 8278–8291.

Kubo, M., Kishi, T., Matsunaga, S., and Iwata, N. (2015). Histamine H3 Receptor Antagonists for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Placebo-Controlled Trials. J. Alzheimers Dis. JAD *48*, 667–671.

Kuhar, M.J. (2016). CART Peptides and Drugs of Abuse: A Review of Recent Progress. J. Drug Alcohol Res. *5*.

Kuhne, S., Wijtmans, M., Lim, H.D., Leurs, R., and de Esch, I.J.P. (2011). Several down, a few to go: histamine H3 receptor ligands making the final push towards the market? Expert Opin. Investig. Drugs *20*, 1629–1648.

Kukko-Lukjanov, T.-K., Soini, S., Taira, T., Michelsen, K.A., Panula, P., and Holopainen, I.E. (2006). Histaminergic neurons protect the developing hippocampus from kainic acid-induced neuronal damage in an organotypic coculture system. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 1088–1097.

Kumar, U., and Patel, S.C. (2007). Immunohistochemical localization of dopamine receptor subtypes (D1R-D5R) in Alzheimer's disease brain. Brain Res. *1131*, 187–196.

Kumar, A., Singh, A., and Ekavali (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. Pharmacol. Rep. *67*, 195–203.

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. Nature *407*, 971–977.

Künzle, H. (1975). Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in Macaca fascicularis. Brain Res. *88*, 195–209.

Kuramasu, A., Sukegawa, J., Sato, T., Sakurai, E., Watanabe, T., Yanagisawa, T., and Yanai, K. (2011). The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H(3) receptor are involved in receptor-G-protein coupling. Cell. Signal. *23*, 1843–1849.

Kuszak, A.J., Pitchiaya, S., Anand, J.P., Mosberg, H.I., Walter, N.G., and Sunahara, R.K. (2009). Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by Gi2. J. Biol. Chem. *284*, 26732–26741.

Kwiatkowski, H. (1943). Histamine in nervous tissue. J. Physiol. *102*, 32–41.

Ladépêche, L., Dupuis, J.P., and Groc, L. (2013). Surface trafficking of NMDA receptors: Gathering from a partner to another. Semin. Cell Dev. Biol.

Ladepeche, L., Yang, L., Bouchet, D., and Groc, L. (2013a). Regulation of dopamine D1 receptor dynamics within the postsynaptic density of hippocampal glutamate synapses. PloS One *8*, e74512.

Ladepeche, L., Dupuis, J.P., Bouchet, D., Doudnikoff, E., Yang, L., Campagne, Y., Bézard, E., Hosy, E., and Groc, L. (2013b). Single-molecule imaging of the functional crosstalk between surface NMDA and dopamine D1 receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 18005–18010.

Lai, C.T., and Yu, P.H. (1997). Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. Biochem. Pharmacol. *53*, 363–372.

Lai, X., Ye, L., Liao, Y., Jin, L., Ma, Q., Lu, B., Sun, Y., Shi, Y., and Zhou, N. (2016). Agonist-induced activation of histamine H3 receptor signals to extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through PKC-, PLD-, and EGFR-dependent mechanisms. J. Neurochem. *137*, 200–215.

Landles, C., and Bates, G.P. (2004). Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. EMBO Rep. *5*, 958–963.

Landles, C., Sathasivam, K., Weiss, A., Woodman, B., Moffitt, H., Finkbeiner, S., Sun, B., Gafni, J., Ellerby, L.M., Trottier, Y., et al. (2010). Proteolysis of Mutant Huntingtin Produces an Exon 1 Fragment That Accumulates as an Aggregated Protein in Neuronal Nuclei in Huntington Disease. J. Biol. Chem. *285*, 8808–8823.

Latorraca, N.R., Venkatakrishnan, A.J., and Dror, R.O. (2017). GPCR Dynamics: Structures in Motion. Chem. Rev. *117*, 139–155.

Lau, A., and Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. Pflugers Arch. *460*, 525–542.

Lau, C.G., and Zukin, R.S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 413–426.

Łażewska, D., and Kieć-Kononowicz, K. (2018). Progress in the development of histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists: a patent review (2013-2017). Expert Opin. Ther. Pat. 1–22.

Le, W.D., Colom, L.V., Xie, W.J., Smith, R.G., Alexianu, M., and Appel, S.H. (1995). Cell death induced by beta-amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. Brain Res. *686*, 49–60.

Le Foll, B., Gallo, A., Le Strat, Y., Lu, L., and Gorwood, P. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. Behav. Pharmacol. *20*, 1–17.

Lee, C., and Chern, Y. (2014). Adenosine receptors and Huntington's disease. Int. Rev. Neurobiol. *119*, 195–232.

Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J.C., Goehring, A., Du, J., Song, X., and Gouaux, E. (2014a). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. Nature *511*, 191–197.

Lee, D.K., Ahn, S.M., Shim, Y.-B., Koh, W.C.A., Shim, I., and Choe, E.S. (2011). Interactions of Dopamine D1 and N-methyl-D-Aspartate Receptors are Required for Acute Cocaine-Evoked Nitric Oxide Efflux in the Dorsal Striatum. Exp. Neurobiol. *20*, 116–122.

Lee, F.J.S., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chéry, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X., and Liu, F. (2002). Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. Cell *111*, 219–230.

Lee, M.-C., Ting, K.K., Adams, S., Brew, B.J., Chung, R., and Guillemin, G.J. (2010). Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. PloS One *5*, e14123.

Lee, S.-M., Yang, Y., and Mailman, R.B. (2014b). Dopamine D1 receptor signaling: does GαQ-phospholipase C actually play a role? J. Pharmacol. Exp. Ther. *351*, 9–17.

Lemiere, J., Decruyenaere, M., Evers-Kiebooms, G., Vandenbussche, E., and Dom, R. (2004). Cognitive changes in patients with Huntington's disease (HD) and asymptomatic carriers of the HD mutation--a longitudinal follow-up study. J. Neurol. *251*, 935–942.

Lerman, C., and Berrettini, W. (2003). Elucidating the role of genetic factors in smoking behavior and nicotine dependence. Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet. *118B*, 48–54.

Leurs, R., Bakker, R.A., Timmerman, H., and de Esch, I.J.P. (2005). The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. Nat. Rev. Drug Discov. *4*, 107–120.

Lever, J.R., Fergason-Cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Lord, S.A., Xu, R., Miller, D.K., and Lever, S.Z. (2016). Cocaine occupancy of sigma1 receptors and dopamine transporters in mice. Synap. N. Y. N *70*, 98–111.

Levinson, J.N., Chéry, N., Huang, K., Wong, T.P., Gerrow, K., Kang, R., Prange, O., Wang, Y.T., and El-Husseini, A. (2005). Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1beta in neuroligin-induced synaptic specificity. J. Biol. Chem. *280*, 17312–17319.

Levy, R., and Goldman-Rakic, P.S. (2000). Segregation of working memory functions within the dorsolateral prefrontal cortex. Exp. Brain Res. *133*, 23–32.

Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? Front. Neurosci. *9*.

Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C., and Oheim, M. (2008). Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca2+-regulated exocytosis from cortical astrocytes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 7648–7658.

Li, D., Hérault, K., Silm, K., Evrard, A., Wojcik, S., Oheim, M., Herzog, E., and Ropert, N. (2013). Lack of evidence for vesicular glutamate transporter expression in mouse astrocytes. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 4434–4455.

Li, H., Wyman, T., Yu, Z.-X., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2003). Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. Hum. Mol. Genet. *12*, 2021–2030.

Li, M., Guo, K., and Ikehara, S. (2014). Stem cell treatment for Alzheimer's disease. Int. J. Mol. Sci. *15*, 19226–19238.

Li, S., Li, Z., Pei, L., Le, A.D., and Liu, F. (2012). The α7nACh–NMDA receptor complex is involved in cue-induced reinstatement of nicotine seeking. J. Exp. Med. *209*, 2141–2147.

Li, W., Silva, H.B., Real, J., Wang, Y.-M., Rial, D., Li, P., Payen, M.-P., Zhou, Y., Muller, C.E., Tomé, A.R., et al. (2015). Inactivation of adenosine A2A receptors reverses working memory deficits at early stages of Huntington's disease models. Neurobiol. Dis. *79*, 70–80.

Liang, J., Lindemeyer, A.K., Suryanarayanan, A., Meyer, E.M., Marty, V.N., Ahmad, S.O., Shao, X.M., Olsen, R.W., and Spigelman, I. (2014). Plasticity of GABA(A) receptor-mediated neurotransmission in the nucleus accumbens of alcohol-dependent rats. J. Neurophysiol. *112*, 39–50.

Liguz-Lecznar, M., and Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.) *67*, 207–218.

Lin, C.-H., Huang, Y.-J., Lin, C.-J., Lane, H.-Y., and Tsai, G.E. (2014). NMDA neurotransmission dysfunction in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Curr. Pharm. Des. *20*, 5169–5179.

Liot, G., Valette, J., Pépin, J., Flament, J., and Brouillet, E. (2017). Energy defects in Huntington's disease: Why "in vivo" evidence matters. Biochem. Biophys. Res. Commun. *483*, 1084–1095.

Liu, Y., and Matsumoto, R.R. (2008). Alterations in fos-related antigen 2 and sigma1 receptor gene and protein expression are associated with the development of cocaine-induced behavioral sensitization: time course and regional distribution studies. J. Pharmacol. Exp. Ther. *327*, 187–195.

Liu, J.C., DeFazio, R.A., Espinosa-Jeffrey, A., Cepeda, C., de Vellis, J., and Levine, M.S. (2004). Calcium modulates dopamine potentiation of N-methyl-D-aspartate responses: electrophysiological and imaging evidence. J. Neurosci. Res. *76*, 315–322.

Liu, X.-Y., Chu, X.-P., Mao, L.-M., Wang, M., Lan, H.-X., Li, M.-H., Zhang, G.-C., Parelkar, N.K., Fibuch, E.E., Haines, M., et al. (2006). Modulation of D2R-NR2B interactions in response to cocaine. Neuron *52*, 897–909.

Liu, Y.F., Jakobs, K.H., Rasenick, M.M., and Albert, P.R. (1994). G protein specificity in receptor-effector coupling. Analysis of the roles of G0 and Gi2 in GH4C1 pituitary cells. J. Biol. Chem. *269*, 13880–13886.

Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., Myre, M.A., Walker, J.A., Pistocchi, A., Conti, L., et al. (2012). An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. Nat. Neurosci. *15*, 713–721.

Lomeli, H., Sprengel, R., Laurie, D.J., Köhr, G., Herb, A., Seeburg, P.H., and Wisden, W. (1993). The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. FEBS Lett. *315*, 318–322.

Lovenberg, T.W., Roland, B.L., Wilson, S.J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M.R., and Erlander, M.G. (1999). Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. Mol. Pharmacol. *55*, 1101–1107.

Lovenberg, T.W., Pyati, J., Chang, H., Wilson, S.J., and Erlander, M.G. (2000). Cloning of rat histamine H(3) receptor reveals distinct species pharmacological profiles. J. Pharmacol. Exp. Ther. *293*, 771–778.

Lozada, A., Munyao, N., Sallmen, T., Lintunen, M., Leurs, R., Lindsberg, P.J., and Panula, P. (2005). Postischemic regulation of central histamine receptors. Neuroscience *136*, 371–379.

Luo, T., Wang, Y., Qin, J., Liu, Z.-G., and Liu, M. (2017). Histamine H3 Receptor Antagonist Prevents Memory Deficits and Synaptic Plasticity Disruption Following Isoflurane Exposure. CNS Neurosci. Ther. *23*, 301–309.

Lüscher, C. (2016). The Emergence of a Circuit Model for Addiction. Annu. Rev. Neurosci. *39*, 257–276.

Lüth, H.-J., Münch, G., and Arendt, T. (2002). Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. Brain Res. *953*, 135–143.

Luttrell, L.M., and Gesty-Palmer, D. (2010). Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. Pharmacol. Rev. *62*, 305–330.

Luttrell, L.M., Maudsley, S., and Gesty-Palmer, D. (2018). Translating in vitro ligand bias into in vivo efficacy. Cell. Signal. *41*, 46–55.

Maggio, R., Vogel, Z., and Wess, J. (1993). Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 3103–3107.

Mahan, L.C., Burch, R.M., Monsma, F.J., and Sibley, D.R. (1990). Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca2+ mobilization in Xenopus oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 2196–2200.

Malinski, T. (2007). Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD *11*, 207–218.

Mallipeddi, S., Janero, D.R., Zvonok, N., and Makriyannis, A. (2017). Functional selectivity at G-protein coupled receptors: Advancing cannabinoid receptors as drug targets. Biochem. Pharmacol. *128*, 1–11.

Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., Pardo, L., Weis, W.I., Kobilka, B.K., and Granier, S. (2012). Crystal structure of the μ-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. Nature *485*, 321–326.

Marcellino, D., Ferré, S., Casadó, V., Cortés, A., Le Foll, B., Mazzola, C., Drago, F., Saur, O., Stark, H., Soriano, A., et al. (2008). Identification of dopamine D1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D1-D3 receptor interactions in the striatum. J. Biol. Chem. *283*, 26016–26025.

Marco, S., Giralt, A., Petrovic, M.M., Pouladi, M.A., Martínez-Turrillas, R., Martínez-Hernández, J., Kaltenbach, L.S., Torres-Peraza, J., Graham, R.K., Watanabe, M., et al. (2013). Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. Nat. Med. *19*, 1030–1038.

Mariottini, C., Scartabelli, T., Bongers, G., Arrigucci, S., Nosi, D., Leurs, R., Chiarugi, A., Blandina, P., Pellegrini-Giampietro, D.E., and Passani, M.B. (2009). Activation of the histaminergic H3 receptor induces phosphorylation of the Akt/GSK-3 beta pathway in cultured cortical neurons and protects against neurotoxic insults. J. Neurochem. *110*, 1469–1478.

Markesbery, W.R., and Carney, J.M. (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. Brain Pathol. Zurich Switz. *9*, 133–146.

Marques Sousa, C., and Humbert, S. (2013). Huntingtin: here, there, everywhere! J. Huntingt. Dis. *2*, 395–403.

Márquez-Gómez, R., Robins, M.T., Gutiérrez-Rodelo, C., Arias, J.-M., Olivares-Reyes, J.-A., van Rijn, R.M., and Arias-Montaño, J.-A. (2017). Functional histamine H3and adenosine A2Areceptor heteromers in recombinant cells and rat striatum. Pharmacol. Res.

Marshall, F.H., Jones, K.A., Kaupmann, K., and Bettler, B. (1999). GABAB receptors - the first 7TM heterodimers. Trends Pharmacol. Sci. *20*, 396–399.

Martina, M., Turcotte, M.-E.B., Halman, S., and Bergeron, R. (2007). The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. J. Physiol. *578*, 143–157.

Martinez, D., Slifstein, M., Narendran, R., Foltin, R.W., Broft, A., Hwang, D.-R., Perez, A., Abi-Dargham, A., Fischman, M.W., Kleber, H.D., et al. (2009). Dopamine D1 receptors in cocaine dependence measured with PET and the choice to self-administer cocaine. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *34*, 1774–1782.

Martorana, A., and Koch, G. (2014). Is dopamine involved in Alzheimer's disease? Front. Aging Neurosci. *6*, 252.

Masini, D., Lopes-Aguiar, C., Bonito-Oliva, A., Papadia, D., Andersson, R., Fisahn, A., and Fisone, G. (2017). The histamine H3 receptor antagonist thioperamide rescues circadian rhythm and memory function in experimental parkinsonism. Transl. Psychiatry *7*, e1088.

Mathis, G. (1995). Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer. Clin. Chem. *41*, 1391–1397.

Matsukawa, N., Maki, M., Yasuhara, T., Hara, K., Yu, G., Xu, L., Kim, K.M., Morgan, J.C., Sethi, K.D., and Borlongan, C.V. (2007). Overexpression of D2/D3 receptors increases efficacy of ropinirole in chronically 6-OHDA-lesioned Parkinsonian rats. Brain Res. *1160*, 113–123.

Matsumoto, R.R., Hewett, K.L., Pouw, B., Bowen, W.D., Husbands, S.M., Cao, J.J., and Newman, A.H. (2001a). Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. Neuropharmacology *41*, 878–886.

Matsumoto, R.R., McCracken, K.A., Friedman, M.J., Pouw, B., De Costa, B.R., and Bowen, W.D. (2001b). Conformationally restricted analogs of BD1008 and an antisense oligodeoxynucleotide targeting sigma1 receptors produce anti-cocaine effects in mice. Eur. J. Pharmacol. *419*, 163–174.

Matsumoto, R.R., McCracken, K.A., Pouw, B., Zhang, Y., and Bowen, W.D. (2002). Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. Neuropharmacology *42*, 1043–1055.

Matsumoto, R.R., Liu, Y., Lerner, M., Howard, E.W., and Brackett, D.J. (2003). Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. Eur. J. Pharmacol. *469*, 1–12.

Matsumoto, R.R., Gilmore, D.L., Pouw, B., Bowen, W.D., Williams, W., Kausar, A., and Coop, A. (2004). Novel analogs of the sigma receptor ligand BD1008 attenuate cocaine-induced toxicity in mice. Eur. J. Pharmacol. *492*, 21–26.

Mattay, V.S., Goldberg, T.E., Fera, F., Hariri, A.R., Tessitore, A., Egan, M.F., Kolachana, B., Callicott, J.H., and Weinberger, D.R. (2003). Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 6186–6191.

Mattson, M.P., LaFerla, F.M., Chan, S.L., Leissring, M.A., Shepel, P.N., and Geiger, J.D. (2000). Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Trends Neurosci. *23*, 222–229.

Mauch, D.H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E.C., Otto, A., and Pfrieger, F.W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. Science *294*, 1354–1357.

Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub, M.A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., Prézeau, L., et al. (2008). Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. Nat. Methods *5*, 561–567.

Maurice, T., and Su, T.-P. (2009). The pharmacology of sigma-1 receptors. Pharmacol. Ther. *124*, 195–206.

Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature *309*, 261–263.

McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. J. Alzheimers Dis. JAD *19*, 355–361.

McKay, M.M., and Morrison, D.K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene *26*, 3113–3121.

McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., and Stadlan, E.M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. Neurology *34*, 939–944.

McLaughlin, B.A., Nelson, D., Erecińska, M., and Chesselet, M.F. (1998). Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. J. Neurochem. *70*, 2406–2415.

McNamara, C.G., Tejero-Cantero, A., Trouche, S., Campo-Urriza, N., and Dupret, D. (2014). Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. Nat. Neurosci. *17*, 1658–1660.

Medina, M. (2018). An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics. Int. J. Mol. Sci. *19*.

Mehta, V.S., and Ram, D. (2014). Role of ranitidine in negative symptoms of schizophrenia--an open label study. Asian J. Psychiatry *12*, 150–154.

Melancon, B.J., Hopkins, C.R., Wood, M.R., Emmitte, K.A., Niswender, C.M., Christopoulos, A., Conn, P.J., and Lindsley, C.W. (2012). Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. J. Med. Chem. *55*, 1445–1464.

Mena-Avila, E., Márquez-Gómez, R., Aquino-Miranda, G., Nieto-Alamilla, G., and Arias-Montaño, J.-A. (2018). Clobenpropit, a histamine H3 receptor antagonist/inverse agonist, inhibits [3H]-dopamine uptake by human neuroblastoma SH-SY5Y cells and rat brain synaptosomes. Pharmacol. Rep. *70*, 146–155.

Menkel, M., Terry, P., Pontecorvo, M., Katz, J.L., and Witkin, J.M. (1991). Selective sigma ligands block stimulant effects of cocaine. Eur. J. Pharmacol. *201*, 251–252.

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

Mésangeau, C., Narayanan, S., Green, A.M., Shaikh, J., Kaushal, N., Viard, E., Xu, Y.-T., Fishback, J.A., Poupaert, J.H., Matsumoto, R.R., et al. (2008). Conversion of a highly selective sigma-1 receptor-ligand to sigma-2 receptor preferring ligands with anticocaine activity. J. Med. Chem. *51*, 1482–1486.

Meunier, J., and Hayashi, T. (2010). Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. J. Pharmacol. Exp. Ther. *332*, 388–397.

Miczek, K.A., and Yoshimura, H. (1982). Disruption of primate social behavior by d-amphetamine and cocaine: differential antagonism by antipsychotics. Psychopharmacology (Berl.) *76*, 163–171.

Miklosi, A.G., Del Favero, G., Bulat, T., Höger, H., Shigemoto, R., Marko, D., and Lubec, G. (2017). Super-resolution Microscopical Localization of Dopamine Receptors 1 and 2 in Rat Hippocampal Synaptosomes. Mol. Neurobiol.

Miller, E.K., Freedman, D.J., and Wallis, J.D. (2002). The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *357*, 1123–1136.

Milligan, G. (2009). G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. Br. J. Pharmacol. *158*, 5–14.

Milligan, G. (2010). The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. Curr. Opin. Pharmacol. *10*, 23–29.

Milnerwood, A.J., Gladding, C.M., Pouladi, M.A., Kaufman, A.M., Hines, R.M., Boyd, J.D., Ko, R.W.Y., Vasuta, O.C., Graham, R.K., Hayden, M.R., et al. (2010). Early increase in extrasynaptic NMDA receptor signaling and expression contributes to phenotype onset in Huntington's disease mice. Neuron *65*, 178–190.

Milnerwood, A.J., Kaufman, A.M., Sepers, M.D., Gladding, C.M., Zhang, L., Wang, L., Fan, J., Coquinco, A., Qiao, J.Y., Lee, H., et al. (2012). Mitigation of augmented extrasynaptic NMDAR signaling and apoptosis in cortico-striatal co-cultures from Huntington's disease mice. Neurobiol. Dis. *48*, 40–51.

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

Missale, C., Fiorentini, C., Collo, G., and Spano, P. (2010). The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. J. Recept. Signal Transduct. Res. *30*, 347–354.

Mochel, F., Durant, B., Meng, X., O'Callaghan, J., Yu, H., Brouillet, E., Wheeler, V.C., Humbert, S., Schiffmann, R., and Durr, A. (2012). Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. J. Biol. Chem. *287*, 1361–1370.

Moffett, M.C., Song, J., and Kuhar, M.J. (2011). CART peptide inhibits locomotor activity induced by simultaneous stimulation of D1 and D2 receptors, but not by stimulation of individual dopamine receptors. Synap. N. Y. N *65*, 1–7.

Mohsen, A., Yoshikawa, T., Miura, Y., Nakamura, T., Naganuma, F., Shibuya, K., Iida, T., Harada, R., Okamura, N., Watanabe, T., et al. (2014). Mechanism of the histamine H(3) receptor-mediated increase in exploratory locomotor activity and anxiety-like behaviours in mice. Neuropharmacology *81*, 188–194.

Molina-Hernández, A., Nuñez, A., Sierra, J.J., and Arias-Montaño, J.A. (2001). Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. Neuropharmacology *41*, 928–934.

Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. J. Biol. Chem. *287*, 32040–32053.

Mony, L., Kew, J.N.C., Gunthorpe, M.J., and Paoletti, P. (2009). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. Br. J. Pharmacol. *157*, 1301–1317.

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. Neuron *12*, 529–540.

Moore, K.E., and Gudelsky, G.A. (1977). Drug actions on dopamine turnover in the median eminence. Adv. Biochem. Psychopharmacol. *16*, 227–235.

Moore, R.Y., and Bloom, F.E. (1978). Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. Annu. Rev. Neurosci. *1*, 129–169.

Moore, C.A.C., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. Annu. Rev. Physiol. *69*, 451–482.

Morales, M., and Margolis, E.B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. Nat. Rev. Neurosci. *18*, 73–85.

Morales-Figueroa, G.-E., Márquez-Gómez, R., González-Pantoja, R., Escamilla-Sánchez, J., and Arias-Montaño, J.-A. (2014). Histamine H3 receptor activation counteracts adenosine A2A receptor-mediated enhancement of depolarization-evoked [3H]-GABA release from rat globus pallidus synaptosomes. ACS Chem. Neurosci. *5*, 637–645.

Morelli, L., Perry, G., and Tagliavini, F. (2012). The contribution of the amyloid hypothesis to the understanding of Alzheimer's disease: a critical overview. Int. J. Alzheimers Dis. *2012*, 709613.

Moreno, E., Hoffmann, H., Gonzalez-Sepúlveda, M., Navarro, G., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Vignes, M., McCormick, P.J., Canela, E.I., et al. (2011a). Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. J. Biol. Chem. *286*, 5846–5854.

Moreno, E., Vaz, S.H., Cai, N.-S., Ferrada, C., Quiroz, C., Barodia, S.K., Kabbani, N., Canela, E.I., McCormick, P.J., Lluis, C., et al. (2011b). Dopamine-galanin receptor heteromers modulate cholinergic neurotransmission in the rat ventral hippocampus. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 7412–7423.

Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., et al. (2014). Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ1-D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *34*, 3545–3558.

Moreno, E., Chiarlone, A., Medrano, M., Puigdellívol, M., Bibic, L., Howell, L.A., Resel, E., Puente, N., Casarejos, M.J., Perucho, J., et al. (2018). Singular Location and Signaling Profile of Adenosine A2A-Cannabinoid CB1 Receptor Heteromers in the Dorsal Striatum. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *43*, 964–977.

Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L.F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M.L., and Bermudez-Rattoni, F. (2016). Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid-β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. Neurobiol. Aging *41*, 187–199.

Morimoto, T., Yamamoto, Y., Mobarakeh, J.I., Yanai, K., Watanabe, T., Watanabe, T., and Yamatodani, A. (1999). Involvement of the histaminergic system in leptin-induced suppression of food intake. Physiol. Behav. *67*, 679–683.

Morishima, M., and Kawaguchi, Y. (2006). Recurrent connection patterns of corticostriatal pyramidal cells in frontal cortex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *26*, 4394–4405.

Morisset, S., Rouleau, A., Ligneau, X., Gbahou, F., Tardivel-Lacombe, J., Stark, H., Schunack, W., Ganellin, C.R., Schwartz, J.C., and Arrang, J.M. (2000). High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. Nature *408*, 860–864.

Morrison, S.E., McGinty, V.B., du Hoffmann, J., and Nicola, S.M. (2017). Limbic-motor integration by neural excitations and inhibitions in the nucleus accumbens. J. Neurophysiol. *118*, 2549–2567.

Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. *85*, 393–406.

Murray, A.M., Weihmueller, F.B., Marshall, J.F., Hurtig, H.I., Gottleib, G.L., and Joyce, J.N. (1995). Damage to dopamine systems differs between Parkinson's disease and Alzheimer's disease with parkinsonism. Ann. Neurol. *37*, 300–312.

Musacchio, J.M. (1975). Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. In Biochemistry of Biogenic Amines, (Springer, Boston, MA), pp. 1–35.

Naaijen, J., Zwiers, M.P., Amiri, H., Williams, S.C.R., Durston, S., Oranje, B., Brandeis, D., Boecker-Schlier, R., Ruf, M., Wolf, I., et al. (2017). Fronto-Striatal Glutamate in Autism Spectrum Disorder and Obsessive Compulsive Disorder. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *42*, 2456–2465.

Naganuma, F., Nakamura, T., Yoshikawa, T., Iida, T., Miura, Y., Kárpáti, A., Matsuzawa, T., Yanai, A., Mogi, A., Mochizuki, T., et al. (2017). Histamine N-methyltransferase regulates aggression and the sleep-wake cycle. Sci. Rep. *7*, 15899.

Nai, Q., Li, S., Wang, S.-H., Liu, J., Lee, F.J.S., Frankland, P.W., and Liu, F. (2010). Uncoupling the D1-N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. Biol. Psychiatry *67*, 246–254.

Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V.L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., Fowler, C., Li, Q.-X., Martins, R., Rowe, C., et al. (2018). High performance plasma amyloid-β biomarkers for Alzheimer's disease. Nature *554*, 249–254.

Nakamura, S., Takemura, M., Ohnishi, K., Suenaga, T., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., and Kimura, T. (1993). Loss of large neurons and occurrence of neurofibrillary tangles in the tuberomammillary nucleus of patients with Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. *151*, 196–199.

Nakamura, T., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2007). Contribution of glutamatergic signaling to nitrosative stress-induced protein misfolding in normal brain aging and neurodegenerative diseases. Aging Cell *6*, 351–359.

Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., and Yamamoto, T. (2001). Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. J. Biol. Chem. *276*, 693–699.

Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS Lett. *587*, 2046–2054.

Nann-Vernotica, E., Donny, E.C., Bigelow, G.E., and Walsh, S.L. (2001). Repeated administration of the D1/5 antagonist ecopipam fails to attenuate the subjective effects of cocaine. Psychopharmacology (Berl.) *155*, 338–347.

Natarajan, A., Han, G., Chen, S., Yu, P., White, R., and Jose, P. (2010). The d5 dopamine receptor mediates large-conductance, calcium- and voltage-activated potassium channel activation in human coronary artery smooth muscle cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. *332*, 640–649.

Nath, C., and Gupta, M.B. (2001). Role of central histaminergic system in lorazepam withdrawal syndrome in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. *68*, 777–782.

Nathan, P.J., Boardley, R., Scott, N., Berges, A., Maruff, P., Sivananthan, T., Upton, N., Lowy, M.T., Nestor, P.J., and Lai, R. (2013). The safety, tolerability, pharmacokinetics and cognitive effects of GSK239512, a selective histamine H_3 receptor antagonist in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a preliminary investigation. Curr. Alzheimer Res. *10*, 240–251.

Nathans, J., and Hogness, D.S. (1983). Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell *34*, 807–814.

Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E.I., Lluis, C., and Franco, R. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. ScientificWorldJournal *8*, 1088–1097.

Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., et al. (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 18676–18681.

Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., et al. (2013). Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. PloS One *8*, e61245.

Navarro, G., Cordomí, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Perez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., et al. (2016). Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. BMC Biol. *14*, 26.

Navarro, G., Cordomí, A., Casadó-Anguera, V., Moreno, E., Cai, N.-S., Cortés, A., Canela, E.I., Dessauer, C.W., Casadó, V., Pardo, L., et al. (2018). Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. Nat. Commun. *9*, 1242.

Nelson, A.B., and Kreitzer, A.C. (2014). Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction. Annu. Rev. Neurosci. *37*, 117–135.

Nestler, E.J. (2012). Transcriptional mechanisms of drug addiction. Clin. Psychopharmacol. Neurosci. Off. Sci. J. Korean Coll. Neuropsychopharmacol. *10*, 136–143.

Neve, K.A., Seamans, J.K., and Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. J. Recept. Signal Transduct. Res. *24*, 165–205.

Newton, A.C., and Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. Biochim. Biophys. Acta *1376*, 155–172.

Niccolini, F., and Politis, M. (2014). Neuroimaging in Huntington's disease. World J. Radiol. *6*, 301–312.

Niciu, M.J., Kelmendi, B., and Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. Pharmacol. Biochem. Behav. *100*, 656–664.

Nickols, H.H., and Conn, P.J. (2014). Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. Neurobiol. Dis. *61*, 55–71.

Nicola, S.M. (2007). The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. Psychopharmacology (Berl.) *191*, 521–550.

Nieto-Alamilla, G., Márquez-Gómez, R., García-Gálvez, A.-M., Morales-Figueroa, G.-E., and Arias-Montaño, J.-A. (2016). The Histamine H3 Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. Mol. Pharmacol. *90*, 649–673.

Nishibori, M., Tahara, A., Sawada, K., Sakiyama, J., Nakaya, N., and Saeki, K. (2000). Neuronal and vascular localization of histamine N-methyltransferase in the bovine central nervous system. Eur. J. Neurosci. *12*, 415–424.

Nishino, S., Sakurai, E., Nevsimalova, S., Yoshida, Y., Watanabe, T., Yanai, K., and Mignot, E. (2009). Decreased CSF histamine in narcolepsy with and without low CSF hypocretin-1 in comparison to healthy controls. Sleep *32*, 175–180.

Nobili, A., Latagliata, E.C., Viscomi, M.T., Cavallucci, V., Cutuli, D., Giacovazzo, G., Krashia, P., Rizzo, F.R., Marino, R., Federici, M., et al. (2017). Dopamine neuronal loss contributes to memory and reward dysfunction in a model of Alzheimer's disease. Nat. Commun. *8*, 14727.

Nolan, E.B., Harrison, L.M., Lahoste, G.J., and Ruskin, D.N. (2007). Behavioral synergism between D(1) and D(2) dopamine receptors in mice does not depend on gap junctions. Synap. N. Y. N *61*, 279–287.

Nolt, M.J., Lin, Y., Hruska, M., Murphy, J., Sheffler-Colins, S.I., Kayser, M.S., Passer, J., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S., and Dalva, M.B. (2011). EphB controls NMDA receptor function and synaptic targeting in a subunit-specific manner. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 5353–5364.

Nuutinen, S., and Panula, P. (2010). Histamine in neurotransmission and brain diseases. Adv. Exp. Med. Biol. *709*, 95–107.

Nygaard, R., Zou, Y., Dror, R.O., Mildorf, T.J., Arlow, D.H., Manglik, A., Pan, A.C., Liu, C.W., Fung, J.J., Bokoch, M.P., et al. (2013). The dynamic process of β(2)-adrenergic receptor activation. Cell *152*, 532–542.

Oades, R.D., and Halliday, G.M. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. Brain Res. *434*, 117–165.

Oak, J.N., Oldenhof, J., and Van Tol, H.H. (2000). The dopamine D(4) receptor: one decade of research. Eur. J. Pharmacol. *405*, 303–327.

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., and Barak, L.S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. J. Biol. Chem. *275*, 17201–17210.

Obeso, J.A., and Lanciego, J.L. (2011). Past, present, and future of the pathophysiological model of the Basal Ganglia. Front. Neuroanat. *5*, 39.

Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., Mao, K., Lau, A.L., Yeung, S.Y., Humbert, S., et al. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 16889–16894.

Ochaba, J., Morozko, E.L., O'Rourke, J.G., and Thompson, L.M. (2018). Fractionation for Resolution of Soluble and Insoluble Huntingtin Species. J. Vis. Exp. JoVE.

Okamoto, S., Pouladi, M.A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D.E., Zaidi, R., Clemente, A., Kaul, M., Graham, R.K., et al. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. Nat. Med. *15*, 1407–1413.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. Q. Rev. Biophys. *39*, 117–166.

Oliveira, J.M.A. (2010). Mitochondrial bioenergetics and dynamics in Huntington's disease: tripartite synapses and selective striatal degeneration. J. Bioenerg. Biomembr. *42*, 227–234.

Olsen, G.M., and Sonnewald, U. (2015). Glutamate: Where does it come from and where does it go? Neurochem. Int. *88*, 47–52.

Pachernegg, S., Strutz-Seebohm, N., and Hollmann, M. (2012). GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. Trends Neurosci. *35*, 240–249.

Palczewski, K. (2014). Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *55*, 6651–6672.

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

Pandey, P., Mersha, M.D., and Dhillon, H.S. (2013). A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. J. Mol. Signal. *8*, 13.

Panetta, R., and Greenwood, M.T. (2008). Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. Drug Discov. Today *13*, 1059–1066.

Panthi, S., Manandhar, S., and Gautam, K. (2018). Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders. Transl. Neurodegener. *7*, 3.

Panula, P., and Nuutinen, S. (2013). The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 472–487.

Panula, P., Yang, H.Y., and Costa, E. (1984). Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 2572–2576.

Paoletti, P., Vila, I., Rifé, M., Lizcano, J.M., Alberch, J., and Ginés, S. (2008). Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *28*, 10090–10101.

Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 383–400.

Papadakis, M., Hawkins, L.M., and Stephenson, F.A. (2004). Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. J. Biol. Chem. *279*, 14703–14712.

Park, K., Volkow, N.D., Pan, Y., and Du, C. (2013). Chronic cocaine dampens dopamine signaling during cocaine intoxication and unbalances D1 over D2 receptor signaling. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 15827–15836.

Parsons, M.E., and Ganellin, C.R. (2006). Histamine and its receptors. Br. J. Pharmacol. *147 Suppl 1*, S127-135.

Parsons, M.P., and Raymond, L.A. (2014). Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders. Neuron *82*, 279–293.

Pascoli, V., Boer-Saccomani, C., and Hermant, J.-F. (2009). H3 receptor antagonists reverse delay-dependent deficits in novel object discrimination by enhancing retrieval. Psychopharmacology (Berl.) *202*, 141–152.

Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A., and Lüscher, C. (2015). Sufficiency of Mesolimbic Dopamine Neuron Stimulation for the Progression to Addiction. Neuron *88*, 1054–1066.

Paspalas, C.D., and Goldman-Rakic, P.S. (2005). Presynaptic D1 Dopamine Receptors in Primate Prefrontal Cortex: Target-Specific Expression in the Glutamatergic Synapse. J. Neurosci. *25*, 1260–1267.

Passani, M.B., and Blandina, P. (1998). Cognitive implications for H3 and 5-HT3 receptor modulation of cortical cholinergic function: a parallel story. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. *20*, 725–733.

Passani, M.B., Lin, J.-S., Hancock, A., Crochet, S., and Blandina, P. (2004). The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. Trends Pharmacol. Sci. *25*, 618–625.

Patowary, S., Alvarez-Curto, E., Xu, T.-R., Holz, J.D., Oliver, J.A., Milligan, G., and Raicu, V. (2013). The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. Biochem. J. *452*, 303–312.

Payer, D.E., Guttman, M., Kish, S.J., Tong, J., Adams, J.R., Rusjan, P., Houle, S., Furukawa, Y., Wilson, A.A., and Boileau, I. (2016). D3 dopamine receptor-preferring [11C]PHNO PET imaging in Parkinson patients with dyskinesia. Neurology *86*, 224–230.

Pedersen, U.B., Norby, B., Jensen, A.A., Schiødt, M., Hansen, A., Suhr-Jessen, P., Scheideler, M., Thastrup, O., and Andersen, P.H. (1994). Characteristics of stably expressed human dopamine D1a and D1b receptors: atypical behavior of the dopamine D1b receptor. Eur. J. Pharmacol. *267*, 85–93.

Pei, L., Lee, F.J.S., Moszczynska, A., Vukusic, B., and Liu, F. (2004). Regulation of dopamine D1 receptor function by physical interaction with the NMDA receptors. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *24*, 1149–1158.

Pei, L., Li, S., Wang, M., Diwan, M., Anisman, H., Fletcher, P.J., Nobrega, J.N., and Liu, F. (2010). Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. Nat. Med. *16*, 1393–1395.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry *10*, 53–62.

Pellissier, L.P., Barthet, G., Gaven, F., Cassier, E., Trinquet, E., Pin, J.-P., Marin, P., Dumuis, A., Bockaert, J., Banères, J.-L., et al. (2011). G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: evidence that turning on two protomers is more efficient. J. Biol. Chem. *286*, 9985–9997.

Pérez-Navarro, E., Canudas, A.M., Akerund, P., Alberch, J., and Arenas, E. (2000). Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 prevent the death of striatal projection neurons in a rodent model of Huntington's disease. J. Neurochem. *75*, 2190–2199.

Perreault, M.L., Hasbi, A., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2014a). Heteromeric dopamine receptor signaling complexes: emerging neurobiology and disease relevance. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *39*, 156–168.

Perreault, M.L., Shen, M.Y.F., Fan, T., and George, S.R. (2014b). Regulation of c-fos expression by the dopamine D1-D2 receptor heteromer. Neuroscience *285C*, 194–203.

Perroy, J., Raynaud, F., Homburger, V., Rousset, M.-C., Telley, L., Bockaert, J., and Fagni, L. (2008). Direct interaction enables cross-talk between ionotropic and group I metabotropic glutamate receptors. J. Biol. Chem. *283*, 6799–6805.

Pfleger, K.D.G., and Eidne, K.A. (2005). Monitoring the formation of dynamic G-protein-coupled receptor-protein complexes in living cells. Biochem. J. *385*, 625–637.

Philippu, A. (2016). Nitric Oxide: A Universal Modulator of Brain Function. Curr. Med. Chem. *23*, 2643–2652.

Phillipson, O.T. (1979). The cytoarchitecture of the interfascicular nucleus and ventral tegmental area of Tsai in the rat. J. Comp. Neurol. *187*, 85–98.

Picetti, R., Saiardi, A., Abdel Samad, T., Bozzi, Y., Baik, J.H., and Borrelli, E. (1997). Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. Crit. Rev. Neurobiol. *11*, 121–142.

Pievani, M., Bocchetta, M., Boccardi, M., Cavedo, E., Bonetti, M., Thompson, P.M., and Frisoni, G.B. (2013). Striatal morphology in early-onset and late-onset Alzheimer's disease: a preliminary study. Neurobiol. Aging *34*, 1728–1739.

Pillot, C., Heron, A., Cochois, V., Tardivel-Lacombe, J., Ligneau, X., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). A detailed mapping of the histamine H(3) receptor and its gene transcripts in rat brain. Neuroscience *114*, 173–193.

Pinton, L., O Borroto-Escuela, D., Narváez, M., Oflijan, J., F Agnati, L., and Fuxe, K. (2015). Evidence for the existence of dopamine D2R and Sigma 1 allosteric receptor-receptor interaction in the rat brain: role in brain plasticity and cocaine action. SpringerPlus *4*.

Piston, D.W., and Kremers, G.-J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. Trends Biochem. Sci. *32*, 407–414.

Politis, M., Pavese, N., Tai, Y.F., Tabrizi, S.J., Barker, R.A., and Piccini, P. (2008). Hypothalamic involvement in Huntington's disease: an in vivo PET study. Brain J. Neurol. *131*, 2860–2869.

Pollard, H., Moreau, J., Arrang, J.M., and Schwartz, J.C. (1993). A detailed autoradiographic mapping of histamine H3 receptors in rat brain areas. Neuroscience *52*, 169–189.

Popovich, P.G., and Longbrake, E.E. (2008). Can the immune system be harnessed to repair the CNS? Nat. Rev. Neurosci. *9*, 481–493.

Posadas, I., López-Hernández, B., and Ceña, V. (2013). Nicotinic receptors in neurodegeneration. Curr. Neuropharmacol. *11*, 298–314.

Prat, A., and Antel, J. (2005). Pathogenesis of multiple sclerosis. Curr. Opin. Neurol. *18*, 225–230.

Price, C.J., Kim, P., and Raymond, L.A. (1999). D1 dopamine receptor-induced cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation and potentiation of striatal glutamate receptors. J. Neurochem. *73*, 2441–2446.

Puig, M.V., Antzoulatos, E.G., and Miller, E.K. (2014). Prefrontal dopamine in associative learning and memory. Neuroscience *282*, 217–229.

Puigdellívol, M., Saavedra, A., and Pérez-Navarro, E. (2016). Cognitive dysfunction in Huntington's disease: mechanisms and therapeutic strategies beyond BDNF. Brain Pathol. Zurich Switz. *26*, 752–771.

Qian, A., and Johnson, J.W. (2002). Channel gating of NMDA receptors. Physiol. Behav. *77*, 577–582.

Ramirez-Bermudez, J. (2012). Alzheimer's Disease: Critical Notes on the History of a Medical Concept. Arch. Med. Res. *43*, 595–599.

Rangel-Barajas, C., and Rebec, G.V. (2016). Dysregulation of Corticostriatal Connectivity in Huntington's Disease: A Role for Dopamine Modulation. J. Huntingt. Dis. *5*, 303–331.

Ranjan, R., Gupta, P., and Shukla, A.K. (2016). GPCR Signaling: β-arrestins Kiss and Remember. Curr. Biol. CB *26*, R285-288.

Rankovic, Z., Brust, T.F., and Bohn, L.M. (2016). Biased agonism: An emerging paradigm in GPCR drug discovery. Bioorg. Med. Chem. Lett. *26*, 241–250.

Rapanelli, M. (2017). The magnificent two: histamine and the H3 receptor as key modulators of striatal circuitry. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *73*, 36–40.

Rapanelli, M., and Pittenger, C. (2016). Histamine and histamine receptors in Tourette syndrome and other neuropsychiatric conditions. Neuropharmacology *106*, 85–90.

Rapanelli, M., Frick, L.R., Horn, K.D., Schwarcz, R.C., Pogorelov, V., Nairn, A.C., and Pittenger, C. (2016). The Histamine H3 Receptor Differentially Modulates Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Akt Signaling in Striatonigral and Striatopallidal Neurons. J. Biol. Chem. *291*, 21042–21052.

Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M.C., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., and George, S.R. (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 654–659.

Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature *450*, 383–387.

Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011). Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex. Nature *477*, 549–555.

Ray, K. (2011). Neurodegenerative disease: Mitochondria, huntingtin and HD. Nat. Rev. Neurol. *7*, 187.

Raymond, L.A. (2017). Striatal synaptic dysfunction and altered calcium regulation in Huntington disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. *483*, 1051–1062.

Raymond, L.A., André, V.M., Cepeda, C., Gladding, C.M., Milnerwood, A.J., and Levine, M.S. (2011). Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. Neuroscience *198*, 252–273.

Rebec, G.V. (2018). Corticostriatal network dysfunction in Huntington's disease: Deficits in neural processing, glutamate transport, and ascorbate release. CNS Neurosci. Ther. *24*, 281–291.

Reddy, P.H., and Shirendeb, U.P. (2012). Mutant huntingtin, abnormal mitochondrial dynamics, defective axonal transport of mitochondria, and selective synaptic degeneration in Huntington's disease. Biochim. Biophys. Acta *1822*, 101–110.

Reddy, P.S., and Corley, R.B. (1998). Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *20*, 546–554.

Reiner, A., and Deng, Y.-P. (2018). Disrupted striatal neuron inputs and outputs in Huntington's disease. CNS Neurosci. Ther. *24*, 250–280.

Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B., and Young, A.B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 5733–5737.

Reiner, A., Jiao, Y., Del Mar, N., Laverghetta, A.V., and Lei, W.L. (2003). Differential morphology of pyramidal tract-type and intratelencephalically projecting-type corticostriatal neurons and their intrastriatal terminals in rats. J. Comp. Neurol. *457*, 420–440.

Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A.K., and Lefkowitz, R.J. (2012). Molecular mechanism of β-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *52*, 179–197.

Reitz, C. (2012). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. Int. J. Alzheimers Dis. *2012*, 369808.

Reitz, C., and Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Biochem. Pharmacol. *88*, 640–651.

Richtand, N.M., Liu, Y., Ahlbrand, R., Sullivan, J.R., Newman, A.H., and McNamara, R.K. (2010). Dopaminergic Regulation of Dopamine D3 and D3nf Receptor mRNA Expression. Synap. N. Y. N *64*, 634–643.

Riddy, D.M., Cook, A.E., Diepenhorst, N.A., Bosnyak, S., Brady, R., Mannoury la Cour, C., Mocaer, E., Summers, R.J., Charman, W.N., Sexton, P.M., et al. (2017). Isoform-Specific Biased Agonism of Histamine H3 Receptor Agonists. Mol. Pharmacol. *91*, 87–99.

Ridray, S., Griffon, N., Mignon, V., Souil, E., Carboni, S., Diaz, J., Schwartz, J.C., and Sokoloff, P. (1998). Coexpression of dopamine D1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. Eur. J. Neurosci. *10*, 1676–1686.

Rinne, J.O., Anichtchik, O.V., Eriksson, K.S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., Röyttä, M., and Panula, P. (2002). Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. J. Neurochem. *81*, 954–960.

Rivera, A., Alberti, I., Martín, A.B., Narváez, J.A., de la Calle, A., and Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. Eur. J. Neurosci. *16*, 2049–2058.

Robbins, T.W. (2000). From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex. Prog. Brain Res. *126*, 469–483.

Roberson, E.D., Scearce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. Science *316*, 750–754.

Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.-Q., et al. (2011). Amyloid-β/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *31*, 700–711.

Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 623–637.

Robson, M.J., Noorbakhsh, B., Seminerio, M.J., and Matsumoto, R.R. (2012). Sigma-1 receptors: potential targets for the treatment of substance abuse. Curr. Pharm. Des. *18*, 902–919.

Rocha, B.A. (2003). Stimulant and reinforcing effects of cocaine in monoamine transporter knockout mice. Eur. J. Pharmacol. *479*, 107–115.

Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Vicente-Sánchez, A., Berrocoso, E., and Garzón, J. (2012). The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *37*, 338–349.

Rodríguez-Muñoz, M., Sánchez-Blázquez, P., Merlos, M., and Garzón-Niño, J. (2016). Endocannabinoid control of glutamate NMDA receptors: the therapeutic potential and consequences of dysfunction. Oncotarget *7*, 55840–55862.

Rodríguez-Ruiz, M., Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Mallol, J., Cortés, A., Lluís, C., Canela, E.I., Casadó, V., McCormick, P.J., et al. (2016). Heteroreceptor Complexes Formed by Dopamine D1, Histamine H3, and N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors as Targets to Prevent Neuronal Death in Alzheimer's Disease. Mol. Neurobiol.

Rogge, G., Jones, D., Hubert, G.W., Lin, Y., and Kuhar, M.J. (2008). CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 747–758.

Rojas, A., and Dingledine, R. (2013). Ionotropic glutamate receptors: regulation by G-protein-coupled receptors. Mol. Pharmacol. *83*, 746–752.

Romieu, P., Martin-Fardon, R., and Maurice, T. (2000). Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference. Neuroreport *11*, 2885–2888.

Romieu, P., Phan, V.L., Martin-Fardon, R., and Maurice, T. (2002). Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *26*, 444–455.

Roos, R.A. (2010). Huntington's disease: a clinical review. Orphanet J. Rare Dis. *5*, 40.

Root, D.H., Mejias-Aponte, C.A., Zhang, S., Wang, H.-L., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., and Morales, M. (2014). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. Nat. Neurosci. *17*, 1543–1551.

Rosas, H.D., Koroshetz, W.J., Chen, Y.I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M.E., Caplan, K., Marek, K., Seidman, L.J., Makris, N., et al. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. Neurology *60*, 1615–1620.

Rosenblatt, A. (2007). Neuropsychiatry of Huntington's disease. Dialogues Clin. Neurosci. *9*, 191–197.

Rosenkilde, M.M., Benned-Jensen, T., Frimurer, T.M., and Schwartz, T.W. (2010). The minor binding pocket: a major player in 7TM receptor activation. Trends Pharmacol. Sci. *31*, 567–574.

Rosenmann, H. (2013). Immunotherapy for targeting tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies. Curr. Alzheimer Res. *10*, 217–228.

Rosenthal, S.L., and Kamboh, M.I. (2014). Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. Curr. Genet. Med. Rep. *2*, 85–101.

Ross, S.B., and Renyi, A.L. (1967). Inhibition of the uptake of tritiated catecholamines by antidepressant and related agents. Eur. J. Pharmacol. *2*, 181–186.

Roth, A.D., Ramírez, G., Alarcón, R., and Von Bernhardi, R. (2005). Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation. Biol. Res. *38*, 381–387.

Rouleau, A., Ligneau, X., Tardivel-Lacombe, J., Morisset, S., Gbahou, F., Schwartz, J.-C., and Arrang, J.-M. (2002). Histamine H3-receptor-mediated [35S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. Br. J. Pharmacol. *135*, 383–392.

Rudy, C.C., Hunsberger, H.C., Weitzner, D.S., and Reed, M.N. (2015). The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Aging Dis. *6*, 131–148.

Ruscher, K., and Wieloch, T. (2015). The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. J. Pharmacol. Sci. *127*, 30–35.

Russo, S.J., and Nestler, E.J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 609–625.

Ryman-Rasmussen, J.P., Nichols, D.E., and Mailman, R.B. (2005). Differential activation of adenylate cyclase and receptor internalization by novel dopamine D1 receptor agonists. Mol. Pharmacol. *68*, 1039–1048.

Ryu, J.H., Yanai, K., Iwata, R., Ido, T., and Watanabe, T. (1994). Heterogeneous distributions of histamine H3, dopamine D1 and D2 receptors in rat brain. Neuroreport *5*, 621–624.

Sabino, V., Hicks, C., and Cottone, P. (2017). Sigma Receptors and Substance Use Disorders. Adv. Exp. Med. Biol. *964*, 177–199.

Sadek, B., Saad, A., Sadeq, A., Jalal, F., and Stark, H. (2016). Histamine H3 receptor as a potential target for cognitive symptoms in neuropsychiatric diseases. Behav. Brain Res. *312*, 415–430.

Sajikumar, S., and Frey, J.U. (2004). Late-associativity, synaptic tagging, and the role of dopamine during LTP and LTD. Neurobiol. Learn. Mem. *82*, 12–25.

Salahpour, A., Espinoza, S., Masri, B., Lam, V., Barak, L.S., and Gainetdinov, R.R. (2012). BRET biosensors to study GPCR biology, pharmacology, and signal transduction. Front. Endocrinol. *3*, 105.

Sánchez-Blázquez, P., Rodríguez-Muñoz, M., and Garzón, J. (2014). The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. Front. Pharmacol. *4*, 169.

Sánchez-Lemus, E., and Arias-Montaño, J.-A. (2004). Histamine H3 receptor activation inhibits dopamine D1 receptor-induced cAMP accumulation in rat striatal slices. Neurosci. Lett. *364*, 179–184.

Sánchez-Soto, M., Bonifazi, A., Cai, N.S., Ellenberger, M.P., Newman, A.H., Ferré, S., and Yano, H. (2016). Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. Mol. Pharmacol. *89*, 457–466.

Sands, W.A., and Palmer, T.M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. Cell. Signal. *20*, 460–466.

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry *19*, 62–75.

Saper, C.B., Scammell, T.E., and Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. Nature *437*, 1257–1263.

Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T.A., Landles, C., Benjamin, A.C., Bondulich, M.K., Smith, D.L., Faull, R.L.M., Roos, R.A.C., Howland, D., et al. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 2366–2370.

Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. Neuron *89*, 910–926.

Scarselli, M., Annibale, P., McCormick, P.J., Kolachalam, S., Aringhieri, S., Radenovic, A., Corsini, G.U., and Maggio, R. (2016). Revealing G-protein-coupled receptor oligomerization at the single-molecule level through a nanoscopic lens: methods, dynamics and biological function. FEBS J. *283*, 1197–1217.

Schapira, A.H.V. (2002). Neuroprotection and dopamine agonists. Neurology *58*, S9-18.

Schlicker, E., and Kathmann, M. (2001). Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol. Sci. *22*, 565–572.

Schlicker, E., and Kathmann, M. (2017). Role of the Histamine H3Receptor in the Central Nervous System. Handb. Exp. Pharmacol. *241*, 277–299.

Schmid, S.M., and Hollmann, M. (2008). To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? Mol. Neurobiol. *37*, 126–141.

Schmidt, C.J., Thomas, T.C., Levine, M.A., and Neer, E.J. (1992). Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. J. Biol. Chem. *267*, 13807–13810.

Schmidt, H.R., Zheng, S., Gurpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., and Kruse, A.C. (2016). Crystal structure of the human σ1 receptor. Nature *532*, 527–530.

Schmitz, D., Frerking, M., and Nicoll, R.A. (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. Neuron *27*, 327–338.

Schneider, E.H. (2017). New perspectives for a well-known biogenic amine: mast cell-derived histamine as pathophysiological agent in vincristine-induced neuropathic pain. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. *390*, 1085–1086.

Schneider, E.H., and Seifert, R. (2016). The histamine H4-receptor and the central and peripheral nervous system: A critical analysis of the literature. Neuropharmacology *106*, 116–128.

Schneider, E.H., Schnell, D., Papa, D., and Seifert, R. (2009). High constitutive activity and a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H(4)-receptor. Biochemistry (Mosc.) *48*, 1424–1438.

Schneider, E.H., Neumann, D., and Seifert, R. (2014a). Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from HDC-, H3R- and H4R-deficient mice. Neurosci. Biobehav. Rev. *47*, 101–121.

Schneider, E.H., Neumann, D., and Seifert, R. (2014b). Modulation of behavior by the histaminergic system: lessons from H(1)R-and H(2)R-deficient mice. Neurosci. Biobehav. Rev. *42*, 252–266.

Scholz, N., Monk, K.R., Kittel, R.J., and Langenhan, T. (2016). Adhesion GPCRs as a Putative Class of Metabotropic Mechanosensors. Handb. Exp. Pharmacol. *234*, 221–247.

Schüler, T., Mesic, I., Madry, C., Bartholomäus, I., and Laube, B. (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. J. Biol. Chem. *283*, 37–46.

Schulte, J., and Littleton, J.T. (2011). The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. Curr. Trends Neurol. *5*, 65–78.

Schultz, W., Dayan, P., and Montague, P.R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. Science *275*, 1593–1599.

Schwartz, J.C., Arrang, J.M., Garbarg, M., Pollard, H., and Ruat, M. (1991). Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol. Rev. *71*, 1–51.

Schwartz, T.L., Sachdeva, S., and Stahl, S.M. (2012). Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. Front. Pharmacol. *3*, 195.

Scott, L., Kruse, M.S., Forssberg, H., Brismar, H., Greengard, P., and Aperia, A. (2002). Selective up-regulation of dopamine D1 receptors in dendritic spines by NMDA receptor activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 1661–1664.

Scott, L., Zelenin, S., Malmersjö, S., Kowalewski, J.M., Markus, E.Z., Nairn, A.C., Greengard, P., Brismar, H., and Aperia, A. (2006). Allosteric changes of the NMDA receptor trap diffusible dopamine 1 receptors in spines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 762–767.

Seifert, G., Schilling, K., and Steinhäuser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. Nat. Rev. Neurosci. *7*, 194–206.

Shan, L., Hofman, M.A., van Wamelen, D.J., Van Someren, E.J.W., Bao, A.-M., and Swaab Dick, F. (2012). Diurnal fluctuation in histidine decarboxylase expression, the rate limiting enzyme for histamine production, and its disorder in neurodegenerative diseases. Sleep *35*, 713–715.

Shan, L., Bao, A.-M., and Swaab, D.F. (2015). The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. Trends Neurosci. *38*, 167–177.

Shan, L., Bao, A.-M., and Swaab, D.F. (2017). Changes in Histidine Decarboxylase, Histamine N-Methyltransferase and Histamine Receptors in Neuropsychiatric Disorders. Handb. Exp. Pharmacol. *241*, 259–276.

Sharkey, J., Glen, K.A., Wolfe, S., and Kuhar, M.J. (1988). Cocaine binding at sigma receptors. Eur. J. Pharmacol. *149*, 171–174.

Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. Annu. Rev. Biochem. *76*, 823–847.

Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2011). β-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. Trends Pharmacol. Sci. *32*, 521–533.

Shin, J.-Y., Fang, Z.-H., Yu, Z.-X., Wang, C.-E., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2005). Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. J. Cell Biol. *171*, 1001–1012.

Shirendeb, U., Reddy, A.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A., and Reddy, P.H. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. Hum. Mol. Genet. *20*, 1438–1455.

Shonberg, J., Kling, R.C., Gmeiner, P., and Löber, S. (2015). GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. Bioorg. Med. Chem. *23*, 3880–3906.

Sidharthan, N.P., Minchin, R.F., and Butcher, N.J. (2013). Cytosolic sulfotransferase 1A3 is induced by dopamine and protects neuronal cells from dopamine toxicity: role of D1 receptor-N-methyl-D-aspartate receptor coupling. J. Biol. Chem. *288*, 34364–34374.

Sidhu, A., Sullivan, M., Kohout, T., Balen, P., and Fishman, P.H. (1991). D1 dopamine receptors can interact with both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide binding proteins. J. Neurochem. *57*, 1445–1451.

Siehler, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. Br. J. Pharmacol. *158*, 41–49.

Simon, M.I., Strathmann, M.P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. Science *252*, 802–808.

Simons, F.E., Fraser, T.G., Reggin, J.D., and Simons, K.J. (1996). Comparison of the central nervous system effects produced by six H1-receptor antagonists. Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol. *26*, 1092–1097.

Smiley, J.F., Levey, A.I., Ciliax, B.J., and Goldman-Rakic, P.S. (1994). D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 5720–5724.

Smith, Y. (2005). Glutamatergic Pathways. In Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders, (Humana Press), pp. 65–77.

Smith, N.J., and Milligan, G. (2010). Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. Pharmacol. Rev. *62*, 701–725.

Smrcka, A.V. (2008). G protein βγ subunits: Central mediators of G protein-coupled receptor signaling. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *65*, 2191–2214.

Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat. Methods *3*, 995–1000.

Solís, O., and Moratalla, R. (2018). Dopamine receptors: homomeric and heteromeric complexes in L-DOPA-induced dyskinesia. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996.

Solís, O., Garcia-Montes, J.R., González-Granillo, A., Xu, M., and Moratalla, R. (2017). Dopamine D3 Receptor Modulates l-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling. Cereb. Cortex N. Y. N 1991 *27*, 435–446.

Sotnikova, T.D., Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2006). Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter. CNS Neurol. Disord. Drug Targets *5*, 45–56.

Spano, P.F., Govoni, S., and Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. Adv. Biochem. Psychopharmacol. *19*, 155–165.

Stahl, S.M. (2017). Dazzled by the dominions of dopamine: clinical roles of D3, D2, and D1 receptors. CNS Spectr. *22*, 305–311.

Stanley, R.J., and Thomas, G.M.H. (2016). Activation of G Proteins by Guanine Nucleotide Exchange Factors Relies on GTPase Activity. PloS One *11*, e0151861.

Steffan, J.S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y.-Z., Gohler, H., Wanker, E.E., Bates, G.P., Housman, D.E., and Thompson, L.M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. *97*, 6763–6768.

Stevens, D.R., Eriksson, K.S., Brown, R.E., and Haas, H.L. (2001). The mechanism of spontaneous firing in histamine neurons. Behav. Brain Res. *124*, 105–112.

Strehlow, A.N.T., Li, J.Z., and Myers, R.M. (2007). Wild-type huntingtin participates in protein trafficking between the Golgi and the extracellular space. Hum. Mol. Genet. *16*, 391–409.

Stuber, G.D., Hnasko, T.S., Britt, J.P., Edwards, R.H., and Bonci, A. (2010). Dopaminergic terminals in the nucleus accumbens but not the dorsal striatum corelease glutamate. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 8229–8233.

Subasinghe Supundi, Unabia Sharon, Barrow Colin J., Mok Su San, Aguilar Marie-Isabel, and Small David H. (2003). Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Aβ peptides on vascular smooth muscle cells and for Aβ binding to vascular smooth muscle cell membranes. J. Neurochem. *84*, 471–479.

Sulzer, D., Cragg, S.J., and Rice, M.E. (2016). Striatal dopamine neurotransmission: Regulation of release and uptake. Basal Ganglia *6*, 123–148.

Sun, M.-K. (2017). Potential Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia. Curr. Neuropharmacol.

Suo, Z., Su, G., Placzek, A., Kundtz, A., Humphrey, J., Crawford, F., and Mullan, M. (2000). A beta vasoactivity in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci. *903*, 156–163.

Syed, Y.Y. (2016). Pitolisant: First Global Approval. Drugs *76*, 1313–1318.

Syrovatkina, V., Alegre, K.O., Dey, R., and Huang, X.-Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. J. Mol. Biol. *428*, 3850–3868.

Szczepanski, S.M., and Knight, R.T. (2014). Insights into human behavior from lesions to the prefrontal cortex. Neuron *83*, 1002–1018.

Szidonya, L., Cserzo, M., and Hunyady, L. (2008). Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions. J. Endocrinol. *196*, 435–453.

Tackenberg, C., Grinschgl, S., Trutzel, A., Santuccione, A.C., Frey, M.C., Konietzko, U., Grimm, J., Brandt, R., and Nitsch, R.M. (2013). NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. Cell Death Dis. *4*, e608.

Takahashi, H., Matsui, H., Camerer, C., Takano, H., Kodaka, F., Ideno, T., Okubo, S., Takemura, K., Arakawa, R., Eguchi, Y., et al. (2010). Dopamine D1 receptors and nonlinear probability weighting in risky choice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 16567–16572.

Takeshita, Y., Watanabe, T., Sakata, T., Munakata, M., Ishibashi, H., and Akaike, N. (1998). Histamine modulates high-voltage-activated calcium channels in neurons dissociated from the rat tuberomammillary nucleus. Neuroscience *87*, 797–805.

Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M.W., Okamoto, S., Dziewczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A.E., et al. (2013). Aβ induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, E2518-2527.

Tang, T.-S., Slow, E., Lupu, V., Stavrovskaya, I.G., Sugimori, M., Llinás, R., Kristal, B.S., Hayden, M.R., and Bezprozvanny, I. (2005). Disturbed Ca2+ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 2602–2607.

Tang, T.-S., Chen, X., Liu, J., and Bezprozvanny, I. (2007). Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *27*, 7899–7910.

Tao, Y.-M., Yu, C., Wang, W.-S., Hou, Y.-Y., Xu, X.-J., Chi, Z.-Q., Ding, Y.-Q., Wang, Y.-J., and Liu, J.-G. (2017). Heteromers of μ opioid and dopamine D1 receptors modulate opioid-induced locomotor sensitization in a dopamine-independent manner. Br. J. Pharmacol. *174*, 2842–2861.

Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., et al. (2015). Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. *11*, 457–470.

Taylor, K.M., and Snyder, S.H. (1971). Brain histamine: rapid apparent turnover altered by restraint and cold stress. Science *172*, 1037–1039.

Taylor, D.M., Moser, R., Régulier, E., Breuillaud, L., Dixon, M., Beesen, A.A., Elliston, L., Silva Santos, M. de F., Kim, J., Jones, L., et al. (2013). MAP kinase phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1) is neuroprotective in Huntington's disease via additive effects of JNK and p38 inhibition. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 2313–2325.

Tecuapetla, F., Patel, J.C., Xenias, H., English, D., Tadros, I., Shah, F., Berlin, J., Deisseroth, K., Rice, M.E., Tepper, J.M., et al. (2010). Glutamatergic signaling by mesolimbic dopamine neurons in the nucleus accumbens. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *30*, 7105–7110.

Tecuapetla, F., Jin, X., Lima, S.Q., and Costa, R.M. (2016). Complementary Contributions of Striatal Projection Pathways to Action Initiation and Execution. Cell *166*, 703–715.

Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koós, T., and Ibáñez-Sandoval, O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. Front. Neuroanat. *4*, 150.

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

Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., and Huttner, W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. Nat. Cell Biol. *2*, 42–49.

Thiels, E., and Klann, E. (2001). Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. Rev. Neurosci. *12*, 327–345.

Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. Nat. Rev. Neurosci. *5*, 173–183.

Thompson, P.D., Berardelli, A., Rothwell, J.C., Day, B.L., Dick, J.P., Benecke, R., and Marsden, C.D. (1988). The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. Brain J. Neurol. *111 (Pt 2)*, 223–244.

Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., et al. (2016). GPCR-G Protein-β-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. Cell *166*, 907–919.

Tien, L.-T., Ho, I.-K., Loh, H.H., and Ma, T. (2007). Role of mu-opioid receptor in modulation of preproenkephalin mRNA expression and opioid and dopamine receptor binding in methamphetamine-sensitized mice. J. Neurosci. Res. *85*, 673–680.

Tiligada, E., Kyriakidis, K., Chazot, P.L., and Passani, M.B. (2011). Histamine pharmacology and new CNS drug targets. CNS Neurosci. Ther. *17*, 620–628.

Toda, S., Alguacil, L.F., and Kalivas, P.W. (2003). Repeated cocaine administration changes the function and subcellular distribution of adenosine A1 receptor in the rat nucleus accumbens. J. Neurochem. *87*, 1478–1484.

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. *62*, 405–496.

Trettel, F., Rigamonti, D., Hilditch-Maguire, P., Wheeler, V.C., Sharp, A.H., Persichetti, F., Cattaneo, E., and MacDonald, M.E. (2000). Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. Hum. Mol. Genet. *9*, 2799–2809.

Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. Nat. Genet. *10*, 104–110.

Tsai, S.-Y., Hayashi, T., Harvey, B.K., Wang, Y., Wu, W.W., Shen, R.-F., Zhang, Y., Becker, K.G., Hoffer, B.J., and Su, T.-P. (2009). Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 22468–22473.

Tsang, S.W.Y., Vinters, H.V., Cummings, J.L., Wong, P.T.-H., Chen, C.P.L.-H., and Lai, M.K.P. (2008). Alterations in NMDA receptor subunit densities and ligand binding to glycine recognition sites are associated with chronic anxiety in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging *29*, 1524–1532.

Tsuji, Y., Shimada, Y., Takeshita, T., Kajimura, N., Nomura, S., Sekiyama, N., Otomo, J., Usukura, J., Nakanishi, S., and Jingami, H. (2000). Cryptic dimer interface and domain organization of the extracellular region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. J. Biol. Chem. *275*, 28144–28151.

Tsvetanova, N.G., and von Zastrow, M. (2014). Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. Nat. Chem. Biol. *10*, 1061–1065.

Turner, B.D., Kashima, D.T., Manz, K.M., Grueter, C.A., and Grueter, B.A. (2018). Synaptic Plasticity in the Nucleus Accumbens: Lessons Learned from Experience. ACS Chem. Neurosci.

Tyebji, S., Saavedra, A., Canas, P.M., Pliassova, A., Delgado-García, J.M., Alberch, J., Cunha, R.A., Gruart, A., and Pérez-Navarro, E. (2015). Hyperactivation of D1 and A2A receptors contributes to cognitive dysfunction in Huntington's disease. Neurobiol. Dis. *74*, 41–57.

Tzingounis, A.V., and Wadiche, J.I. (2007). Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 935–947.

Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. Cell *141*, 1068–1079.

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

Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol. Scand. Suppl. *367*, 1–48.

Urizar, E., Yano, H., Kolster, R., Galés, C., Lambert, N., and Javitch, J.A. (2011). CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. Nat. Chem. Biol. *7*, 624–630.

Valenza, M., and Cattaneo, E. (2011). Emerging roles for cholesterol in Huntington's disease. Trends Neurosci. *34*, 474–486.

Valjent, E., Pagès, C., Hervé, D., Girault, J.-A., and Caboche, J. (2004). Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. Eur. J. Neurosci. *19*, 1826–1836.

Vallone, D., Picetti, R., and Borrelli, E. (2000). Structure and function of dopamine receptors. Neurosci. Biobehav. Rev. *24*, 125–132.

Van Hoesen, G.W., and Hyman, B.T. (1990). Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. Prog. Brain Res. *83*, 445–457.

Van Tol, H.H., Wu, C.M., Guan, H.C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H.B., and Jovanovic, V. (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. Nature *358*, 149–152.

Vandenberg, R.J., and Ryan, R.M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. Physiol. Rev. *93*, 1621–1657.

VanDongen, A.M., Codina, J., Olate, J., Mattera, R., Joho, R., Birnbaumer, L., and Brown, A.M. (1988). Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein Go. Science *242*, 1433–1437.

Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaum, S.G., Williams, G.V., and Arnsten, A.F.T. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. Nat. Neurosci. *10*, 376–384.

Vincent, S.R., Hökfelt, T., Skirboll, L.R., and Wu, J.Y. (1983). Hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons project to the neocortex. Science *220*, 1309–1311.

Virarkar, M., Alappat, L., Bradford, P.G., and Awad, A.B. (2013). L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. *53*, 1157–1167.

Vohora, D., and Bhowmik, M. (2012). Histamine H3 receptor antagonists/inverse agonists on cognitive and motor processes: relevance to Alzheimer's disease, ADHD, schizophrenia, and drug abuse. Front. Syst. Neurosci. *6*, 72.

Volkow, N.D., and Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. Cell *162*, 712–725.

Volkow, N.D., Wang, G.-J., Tomasi, D., and Baler, R.D. (2013). Unbalanced neuronal circuits in addiction. Curr. Opin. Neurobiol. *23*, 639–648.

Volmat, V., and Pouysségur, J. (2001). Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. Biol. Cell *93*, 71–79.

Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *57*, 369–384.

Vonsattel, J.P., Myers, R.H., Stevens, T.J., Ferrante, R.J., Bird, E.D., and Richardson, E.P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *44*, 559–577.

Vuillaume, I., Vermersch, P., Destée, A., Petit, H., and Sablonnière, B. (1998). Genetic polymorphisms adjacent to the CAG repeat influence clinical features at onset in Huntington's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry *64*, 758–762.

Wacker, D., Stevens, R.C., and Roth, B.L. (2017). How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. Cell *170*, 414–427.

Wada, H., Inagaki, N., Yamatodani, A., and Watanabe, T. (1991). Is the histaminergic neuron system a regulatory center for whole-brain activity? Trends Neurosci. *14*, 415–418.

Walaas, S.I., Aswad, D.W., and Greengard, P. (1983). A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. Nature *301*, 69–71.

Waldhoer, M., Fong, J., Jones, R.M., Lunzer, M.M., Sharma, S.K., Kostenis, E., Portoghese, P.S., and Whistler, J.L. (2005). A heterodimer-selective agonist shows in vivo relevance of G protein-coupled receptor dimers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 9050–9055.

Walter, M., and Stark, H. (2012). Histamine receptor subtypes: a century of rational drug design. Front. Biosci. Sch. Ed. *4*, 461–488.

van Wamelen, D.J., Shan, L., Aziz, N.A., Anink, J.J., Bao, A.-M., Roos, R.A.C., and Swaab, D.F. (2011). Functional increase of brain histaminergic signaling in Huntington's disease. Brain Pathol. Zurich Switz. *21*, 419–427.

Wang, F., Smith, N.A., Xu, Q., Goldman, S., Peng, W., Huang, J.H., Takano, T., and Nedergaard, M. (2013a). Photolysis of caged Ca2+ but not receptor-mediated Ca2+ signaling triggers astrocytic glutamate release. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *33*, 17404–17412.

Wang, H., Chen, X., Li, Y., Tang, T.-S., and Bezprozvanny, I. (2010). Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. Mol. Neurodegener. *5*, 18.

Wang, H.-G., Lu, F.-M., Jin, I., Udo, H., Kandel, E.R., de Vente, J., Walter, U., Lohmann, S.M., Hawkins, R.D., and Antonova, I. (2005). Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. Neuron *45*, 389–403.

Wang, H.Y., Undie, A.S., and Friedman, E. (1995). Evidence for the coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. Mol. Pharmacol. *48*, 988–994.

Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., and Reitz, A.B. (2000). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. J. Biol. Chem. *275*, 5626–5632.

Wang, J., Wang, C.-E., Orr, A., Tydlacka, S., Li, S.-H., and Li, X.-J. (2008). Impaired ubiquitin-proteasome system activity in the synapses of Huntington's disease mice. J. Cell Biol. *180*, 1177–1189.

Wang, J.-Q., Chen, Q., Wang, X., Wang, Q.-C., Wang, Y., Cheng, H.-P., Guo, C., Sun, Q., Chen, Q., and Tang, T.-S. (2013b). Dysregulation of mitochondrial calcium signaling and superoxide flashes cause mitochondrial genomic DNA damage in Huntington disease. J. Biol. Chem. *288*, 3070–3084.

Wang, M., Wong, A.H., and Liu, F. (2012). Interactions between NMDA and dopamine receptors: a potential therapeutic target. Brain Res. *1476*, 154–163.

Wang, T.-M., Brown, B.M., Deng, L., Sellers, B.D., Lupardus, P.J., Wallweber, H.J.A., Gustafson, A., Wong, E., Volgraf, M., Schwarz, J.B., et al. (2017). A novel NMDA receptor positive allosteric modulator that acts via the transmembrane domain. Neuropharmacology *121*, 204–218.

Waszczak, B.L., Martin, L.P., Finlay, H.E., Zahr, N., and Stellar, J.R. (2002). Effects of individual and concurrent stimulation of striatal D1 and D2 dopamine receptors on electrophysiological and behavioral output from rat basal ganglia. J. Pharmacol. Exp. Ther. *300*, 850–861.

Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., and Wada, H. (1984). Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. Brain Res. *295*, 13–25.

Weber, J., Siddiqui, M.A.A., Wagstaff, A.J., and McCormack, P.L. (2010). Low-dose doxepin: in the treatment of insomnia. CNS Drugs *24*, 713–720.

Weibrecht, I., Leuchowius, K.-J., Clausson, C.-M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W.M., Kamali-Moghaddam, M., and Söderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. Expert Rev. Proteomics *7*, 401–409.

Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 875–885.

Wellendorph, P., Goodman, M.W., Burstein, E.S., Nash, N.R., Brann, M.R., and Weiner, D.M. (2002). Molecular cloning and pharmacology of functionally distinct isoforms of the human histamine H(3) receptor. Neuropharmacology *42*, 929–940.

Wenzel-Seifert, K., Kelley, M.T., Buschauer, A., and Seifert, R. (2001). Similar apparent constitutive activity of human histamine H(2)-receptor fused to long and short splice variants of G(salpha). J. Pharmacol. Exp. Ther. *299*, 1013–1020.

Wersinger, C., Chen, J., and Sidhu, A. (2004). Bimodal induction of dopamine-mediated striatal neurotoxicity is mediated through both activation of D1 dopamine receptors and autoxidation. Mol. Cell. Neurosci. *25*, 124–137.

van der Westhuizen, E.T., Breton, B., Christopoulos, A., and Bouvier, M. (2014). Quantification of ligand bias for clinically relevant β2-adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. Mol. Pharmacol. *85*, 492–509.

van der Westhuizen, E.T., Valant, C., Sexton, P.M., and Christopoulos, A. (2015). Endogenous allosteric modulators of G protein-coupled receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. *353*, 246–260.

Westphal, C. (1883). Ueber eine dem Bilde der cerebrospinalen grauen Degeneration ähnliche Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomischen Befund, nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contraction. Arch. Für Psychiatr. Nervenkrankh. *14*, 87–134.

Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. Physiol. Rev. *85*, 1159–1204.

White, T. (1959). Formation and catabolism of histamine in brain tissue in vitro. J. Physiol. *149*, 34–42.

Whorton, M.R., Bokoch, M.P., Rasmussen, S.G.F., Huang, B., Zare, R.N., Kobilka, B., and Sunahara, R.K. (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 7682–7687.

Wiescholleck, V., and Manahan-Vaughan, D. (2014). Antagonism of D1/D5 receptors prevents long-term depression (LTD) and learning-facilitated LTD at the perforant path-dentate gyrus synapse in freely behaving rats. Hippocampus *24*, 1615–1622.

Williams, R.H., Chee, M.J.S., Kroeger, D., Ferrari, L.L., Maratos-Flier, E., Scammell, T.E., and Arrigoni, E. (2014). Optogenetic-Mediated Release of Histamine Reveals Distal and Autoregulatory Mechanisms for Controlling Arousal. J. Neurosci. *34*, 6023–6029.

Wisler, J.W., Xiao, K., Thomsen, A.R.B., and Lefkowitz, R.J. (2014). Recent developments in biased agonism. Curr. Opin. Cell Biol. *27*, 18–24.

Wolf, M.E. (2016). Synaptic mechanisms underlying persistent cocaine craving. Nat. Rev. Neurosci. *17*, 351–365.

Wootten, D., Christopoulos, A., and Sexton, P.M. (2013). Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov. *12*, 630–644.

Wreggett, K.A., and Wells, J.W. (1995). Cooperativity manifest in the binding properties of purified cardiac muscarinic receptors. J. Biol. Chem. *270*, 22488–22499.

Wu, J., Anwyl, R., and Rowan, M.J. (1995). beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. Neuroreport *6*, 2409–2413.

Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., and Husemann, J. (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. Nat. Med. *9*, 453–457.

Xenias, H.S., Ibáñez-Sandoval, O., Koós, T., and Tepper, J.M. (2015). Are striatal tyrosine hydroxylase interneurons dopaminergic? J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *35*, 6584–6599.

Xu, Y., Yan, J., Zhou, P., Li, J., Gao, H., Xia, Y., and Wang, Q. (2012). Neurotransmitter receptors and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prog. Neurobiol. *97*, 1–13.

Yahr, M.D., Duvoisin, R.C., Schear, M.J., Barrett, R.E., and Hoehn, M.M. (1969). Treatment of parkinsonism with levodopa. Arch. Neurol. *21*, 343–354.

Yamamoto, K., Mirabeau, O., Bureau, C., Blin, M., Michon-Coudouel, S., Demarque, M., and Vernier, P. (2013a). Evolution of dopamine receptor genes of the D1 class in vertebrates. Mol. Biol. Evol. *30*, 833–843.

Yamamoto, N., Arima, H., Naruse, K., Kasahara, R., Taniura, H., Hirate, H., Sugiura, T., Suzuki, K., and Sobue, K. (2013b). Ketamine reduces amyloid β-protein degradation by suppressing neprilysin expression in primary cultured astrocytes. Neurosci. Lett. *545*, 54–58.

Yamasaki, M., and Takeuchi, T. (2017). Locus Coeruleus and Dopamine-Dependent Memory Consolidation. Neural Plast. *2017*, 8602690.

Yamazaki, M., Araki, K., Shibata, A., and Mishina, M. (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. Biochem. Biophys. Res. Commun. *183*, 886–892.

Yan, H., Zhang, X., Hu, W., Ma, J., Hou, W., Zhang, X., Wang, X., Gao, J., Shen, Y., Lv, J., et al. (2014). Histamine H3 receptors aggravate cerebral ischaemic injury by histamine-independent mechanisms. Nat. Commun. *5*, 3334.

Yang, H., de Jong, J.W., Tak, Y., Peck, J., Bateup, H.S., and Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. Neuron *97*, 434-449.e4.

Yang, L., Yao, H., Chen, X., Cai, Y., Callen, S., and Buch, S. (2016). Role of Sigma Receptor in Cocaine-Mediated Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein: Implications for HAND. Mol. Neurobiol. *53*, 1329–1342.

Yang, Z., Yang, F., Zhang, D., Liu, Z., Lin, A., Liu, C., Xiao, P., Yu, X., and Sun, J.-P. (2017). Phosphorylation of G Protein-Coupled Receptors: From the Barcode Hypothesis to the Flute Model. Mol. Pharmacol. *92*, 201–210.

Yanovsky, Y., Li, S., Klyuch, B.P., Yao, Q., Blandina, P., Passani, M.B., Lin, J.-S., Haas, H.L., and Sergeeva, O.A. (2011). L-Dopa activates histaminergic neurons. J. Physiol. *589*, 1349–1366.

Yao, H., Allen, J.E., Zhu, X., Callen, S., and Buch, S. (2009a). Cocaine and human immunodeficiency virus type 1 gp120 mediate neurotoxicity through overlapping signaling pathways. J. Neurovirol. *15*, 164–175.

Yao, H., Duan, M., and Buch, S. (2011). Cocaine-mediated induction of platelet-derived growth factor: implication for increased vascular permeability. Blood *117*, 2538–2547.

Yao, W.-D., Spealman, R.D., and Zhang, J. (2008). Dopaminergic signaling in dendritic spines. Biochem. Pharmacol. *75*, 2055–2069.

Yao, X.J., Vélez Ruiz, G., Whorton, M.R., Rasmussen, S.G.F., DeVree, B.T., Deupi, X., Sunahara, R.K., and Kobilka, B. (2009b). The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 9501–9506.

Yashiro, K., and Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. Neuropharmacology *55*, 1081–1094.

Yasui, Y., and Su, T.-P. (2016). Potential Molecular Mechanisms on the Role of the Sigma-1 Receptor in the Action of Cocaine and Methamphetamine. J. Drug Alcohol Res. *5*.

Yetnikoff, L., Lavezzi, H.N., Reichard, R.A., and Zahm, D.S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. Neuroscience *282*, 23–48.

Yin, H.H., and Knowlton, B.J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. Nat. Rev. Neurosci. *7*, 464–476.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. Growth Factors Chur Switz. *24*, 21–44.

Yoshikawa, T., and Yanai, K. (2017). Histamine Clearance Through Polyspecific Transporters in the Brain. Handb. Exp. Pharmacol. *241*, 173–187.

Yoshikawa, T., Naganuma, F., Iida, T., Nakamura, T., Harada, R., Mohsen, A.S., Kasajima, A., Sasano, H., and Yanai, K. (2013). Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. Glia *61*, 905–916.

Yuan Xiang, P., Janc, O., Grochowska, K.M., Kreutz, M.R., and Reymann, K.G. (2016). Dopamine agonists rescue Aβ–induced LTP impairment by Src-family tyrosine kinases. Neurobiol. Aging *40*, 98–102.

Zeron, M.M., Chen, N., Moshaver, A., Lee, A.T., Wellington, C.L., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2001). Mutant huntingtin enhances excitotoxic cell death. Mol. Cell. Neurosci. *17*, 41–53.

Zeron, M.M., Hansson, O., Chen, N., Wellington, C.L., Leavitt, B.R., Brundin, P., Hayden, M.R., and Raymond, L.A. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. Neuron *33*, 849–860.

van Zessen, R., Phillips, J.L., Budygin, E.A., and Stuber, G.D. (2012). Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. Neuron *73*, 1184–1194.

Zhang, H., and Sulzer, D. (2012). Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto- and heteroreceptors. Basal Ganglia *2*, 5–13.

Zhang, B., Albaker, A., Plouffe, B., Lefebvre, C., and Tiberi, M. (2014). Constitutive activities and inverse agonism in dopamine receptors. Adv. Pharmacol. San Diego Calif *70*, 175–214.

Zhang, D., Zhang, L., Tang, Y., Zhang, Q., Lou, D., Sharp, F.R., Zhang, J., and Xu, M. (2005). Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. *30*, 1443–1454.

Zhang, D., Zhao, Q., and Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. Mol. Cells *38*, 836–842.

Zhang, J., Xu, T.-X., Hallett, P.J., Watanabe, M., Grant, S.G.N., Isacson, O., and Yao, W.-D. (2009). PSD-95 uncouples dopamine-glutamate interaction in the D1/PSD-95/NMDA receptor complex. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 2948–2960.

Zhang, S.-J., Steijaert, M.N., Lau, D., Schütz, G., Delucinge-Vivier, C., Descombes, P., and Bading, H. (2007). Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. Neuron *53*, 549–562.

Zhang, Y., Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M.E., Hayden, M.R., and Friedlander, R.M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. EMBO J. *25*, 5896–5906.

Zhang, Y., Li, P., Feng, J., and Wu, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. Neurol. Sci. *37*, 1039–1047.

Zhou, Y., and Danbolt, N.C. (2014). Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. J. Neural Transm. Vienna Austria 1996 *121*, 799–817.

Zhou, X.E., Melcher, K., and Xu, H.E. (2017). Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. Curr. Opin. Struct. Biol. *45*, 150–159.

Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G.-D., Hell, J.W., Kennedy, M.B., and Silva, A.J. (2007). Interactions between the NR2B Receptor and CaMKII Modulate Synaptic Plasticity and Spatial Learning. J. Neurosci. *27*, 13843–13853.

Zhu, S., and Paoletti, P. (2015). Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. Curr. Opin. Pharmacol. *20*, 14–23.

Zhu, W., Mao, Z., Zhu, C., Li, M., Cao, C., Guan, Y., Yuan, J., Xie, G., and Guan, X. (2016). Adolescent exposure to cocaine increases anxiety-like behavior and induces morphologic and neurochemical changes in the hippocampus of adult rats. Neuroscience *313*, 174–183.

Zidar, D.A., Violin, J.D., Whalen, E.J., and Lefkowitz, R.J. (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 9649–9654.

Zimmermann, T. (2005). Spectral imaging and linear unmixing in light microscopy. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. *95*, 245–265.

Zorumski, C.F., and Izumi, Y. (2012). NMDA receptors and metaplasticity: Mechanisms and possible roles in neuropsychiatric disorders. Neurosci. Biobehav. Rev. *36*, 989–1000.

Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2014). Huntington's disease. Handb. Exp. Pharmacol. *220*, 357–409.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., et al. (2001). Loss of Huntingtin-Mediated BDNF Gene Transcription in Huntington's Disease. Science *293*, 493–498.

(1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. Cell *72*, 971–983.

7. ANEXO

Expert Opinion on Drug Discovery

ISSN: 1746-0441 (Print) 1746-045X (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iedc20

Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies

Antoni Cortés, Estefanía Moreno, Mar Rodríguez-Ruiz, Enric I. Canela & Vicent Casadó

To cite this article: Antoni Cortés, Estefanía Moreno, Mar Rodríguez-Ruiz, Enric I. Canela & Vicent Casadó (2016) Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies, Expert Opinion on Drug Discovery, 11:7, 641-664, DOI: 10.1080/17460441.2016.1185413

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2016.1185413

Accepted author version posted online: 02 May 2016.
Published online: 30 May 2016.

Submit your article to this journal

Article views: 355

View related articles

View Crossmark data

Citing articles: 3 View citing articles

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iedc20

EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY, 2016
VOL. 11, NO. 7, 641–664
http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2016.1185413

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Targeting the dopamine D3 receptor: an overview of drug design strategies

Antoni Cortés[a,b], Estefanía Moreno[a,b], Mar Rodríguez-Ruiz[a,b], Enric I. Canela[a,b] and Vicent Casadó[a,b]

[a]Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain; [b]Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Faculty of Biology, Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Introduction: Dopamine is a neurotransmitter widely distributed in both the periphery and the central nervous system (CNS). Its physiological effects are mediated by five closely related G protein-coupled receptors (GPCRs) that are divided into two major subclasses: the D_1-like (D_1, D_5) and the D_2-like (D_2, D_3, D_4) receptors. D3 receptors (D_3Rs) have the highest density in the limbic areas of the brain, which are associated with cognitive and emotional functions. These receptors are therefore attractive targets for therapeutic management.

Areas covered: This review summarizes the functional and pharmacological characteristics of D_3Rs, including the design and clinical relevance of full agonists, partial agonists and antagonists, as well as the capacity of these receptors to form active homodimers, heterodimers or higher order receptor complexes as pharmacological targets in several neurological and neurodegenerative disorders.

Expert opinion: The high sequence homology between D_3R and the D_2-type challenges the development of D_3R-selective compounds. The design of new D_3R-preferential ligands with improved physicochemical properties should provide a better pharmacokinetic/bioavailability profile and lesser toxicity than is found with existing D_3R ligands. It is also essential to optimize D_3R affinity and, especially, D_3R vs. D_2-type binding and functional selectivity ratios. Developing allosteric and bitopic ligands should help to improve the D_3R selectivity of these drugs. As most evidence points to the ability of GPCRs to form homomers and heteromers, the most promising therapeutic strategy in the future is likely to involve the application of heteromer-selective drugs. These selective ligands would display different affinities for a given receptor depending on the receptor partners within the heteromer. Therefore, designing novel compounds that specifically target and modulate D_1R–D_3R heteromers would be an interesting approach for the treatment of levodopa (L-DOPA)-induced dyskinesias.

ARTICLE HISTORY
Received 12 February 2016
Accepted 29 April 2016
Published online 30 May 2016

KEYWORDS
Allosteric modulation; drug addiction; GPCR; heteromerization; heteromer-selective drug; homomerization; L-DOPA-induced dyskinesia; Parkinson's disease; restless legs syndrome; schizophrenia

1. Introduction

Dopamine [IUPAC name: 4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol] is a pleiotropic compound that acts as a catecholamine neurotransmitter and a hormone. It is widely distributed in both the periphery and the central nervous system (CNS), as well as in some peripheral non-neuronal areas including the pituitary gland, blood vessels, human adipose tissue, and the cardiovascular and renal systems.[1] Dopamine is also present in most, if not all, immune cells and accumulating pharmacological and genetic evidence has indicated a crucial role of dopamine in the regulation of inflammatory responses involved in autoimmune disorders.[2] Dopamine is synthesized mainly by the nervous tissue in the dopaminergic (DAergic) neurons present in the *substantia nigra pars compacta* (SNc), in the ventral tegmental area (VTA), and in the *arcuate* and periventricular nucleus of the hypothalamus. The major DAergic sources are: the nigrostriatal pathway, the mesocorticolimbic pathway and the tuberoinfundibular pathway, all of them involved in different neurophysiological features.[1,2] DAergic neurons are involved in the control of movements, cognition, emotions, memory, attention, sleep regulation, in the pleasure and reward pathway and in the tonic inhibition of prolactin secretion by the pituitary gland.[1,3]

Dopamine is produced from the amino acid L-tyrosine through tyrosine hydroxylase (TH) catalysis to levodopa (L-DOPA) and subsequent decarboxylation to dopamine by the aromatic amino acid decarboxylase, also known as Dopa decarboxylase.[4] TH is strongly regulated to control dopamine synthesis and, under normal physiological conditions, the transport of L-tyrosine across the blood–brain barrier and subsequent conversion to L-DOPA by TH are fully saturated.[5] After synthesis, dopamine is readily sequestered into synaptic vesicles by secondary active transport through the vesicular monoamine transporter 2.[6] In response to a presynaptic action potential, vesicles are recruited to the cell membrane where they dock, fuse and release their contents into the synapse; there, they bind to dopamine receptors (DRs) causing a response in the postsynaptic neuron. To stop signaling, extracellular dopamine has to be removed from the synaptic cleft. It can either be recycled after reuptake by DAergic neurons using the dopamine transporter,[7] or be degraded by intraneural monoamine oxidase (MAO) A and

CONTACT Vicent Casadó vcasado@ub.edu Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Biochemistry and Biomedicine, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Article highlights

- Limbic areas and, more specifically, the mesolimbic pathways, contain the highest density of D_3Rs in the brain. As these pathways are associated with cognitive and emotional functions, D_3Rs are a target of pharmacotherapeutic interest in a variety of neurological and neuropsychiatric disorders including PD, RLS, schizophrenia and drug addiction.
- D_3R and D_2R share 79% amino acid sequence homology in their transmembrane regions and near the identity of the residues inferred to form their binding site. Consequently, most D_3R ligands are also active in D_2R, making their use as chemical probes problematic.
- A number of promising D_3R-selective compounds, such as the antagonists GSK598809, YQA14 and SR21502, have recently been developed, and they show high affinity, selectivity and half-life, as well as improved oral bioavailability and pharmacodynamic properties.
- Many GPCRs can function as oligomers and are capable of forming heteromeric complexes with novel properties. Allosteric mechanisms are responsible for many of their exclusive properties.
- To date, four different D_3R oligomers have been reported: the D_3R-D_3R homomer, the A_{2A}R-D_3R heteromer, the D_2R-D_3R heteromer and the D_1R-D_3R heteromer, the latter being the most widely studied.
- The use of heteromer-selective drugs is likely to be the most promising therapeutic strategy in the future. These selective ligands would display different affinities for a given receptor depending on the receptor partners within the heteromer.

This box summarizes key points contained in the article.

by MAO A, MAO B and catechol-O-methyl transferases present in glial cells,[4] with 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanilic acid being the main degradation products of dopamine.[5]

The physiological effects of dopamine are mediated by five closely related yet functionally distinct G protein-coupled receptors (GPCRs) that are divided into two major subclasses: the D_1-like (D_1, D_5) and the D_2-like (D_2, D_3, D_4) receptors.[8] DRs differ in their CNS and peripheral distribution, the levels of receptor expression, their affinity for dopamine and functional properties, in the specificity for G-protein coupling and signaling, and in their regulation and desensitization.[8–10] Except in ventral striatum of human brain, the D_1R and D_2R subtypes are found at more than 10-fold the levels of the D_3R, D_4R and D_5R subtypes.[11] Comparative radioligand binding studies showed that dopamine has higher affinity for D_3R than for D_2R; this fact supports a great occupancy of D_3R by endogenous dopamine *in vivo* using the radiotracer [^{18}F]LS-3–134 versus a low occupancy of D_2R by dopamine with a radiotracer D_2R-selective.[10,12] The D_1R subfamily is generally coupled to $G\alpha_s$ and $G\alpha_{olf}$ and stimulates the production of cAMP through activation of adenylate cyclase (AC) and activates protein kinase A (PKA). The D_2R subfamily is coupled to $G\alpha_i$ and $G\alpha_o$ and downregulates the production of cAMP through inhibition of AC, resulting in a decrease in PKA activity.[8] Several studies have revealed that DRs can exert some of their biological effects through alternative cAMP-independent signaling pathways involving ion channels, receptor tyrosine kinases, protein kinase B, mitogen-activated protein kinase (MAPK) or proteins such as β-arrestins.[3,8,9] Here we summarize the functional and pharmacological properties of D_3R and focus especially on the relevance in the CNS of the oligomer complexes that D_3R can form.

2. Functional and pharmacological characteristics of dopamine D3 receptors

D_3Rs have a widespread influence on dopamine release, on DAergic function and on several other neurotransmitters, making them attractive targets for therapeutic intervention.[13] Unlike D_2R and D_1R, which are highly expressed in the caudate-putamen,[11,14] the highest density of D_3R is in the limbic areas of the human brain and, in particular, in the mesolimbic pathways, which are associated with cognitive and emotional functions. Specifically, the highest levels of D_3R are found in the islands of Calleja, nucleus *accumbens* (NAc) and olfactory tubercle, with low levels in the caudate nucleus and putamen.[11,14] In extrastriatal regions of human brain moderate to low levels of dopamine D_3R protein were present in both segments of the *globus pallidus*, the thalamus, hypothalamus, amygdala, both parts of the SN and the VTA.[11,14] Recent autoradiographic results carried out with the radiolabeled D_3R partial agonist [^{3}H]WC-10 in aged human brain showed 2–3 times lower D_3R levels than both D_1R and D_2R in the caudate nucleus, putamen and NAc, and 2–3 times higher in the SN.[15,16] The same authors also reported low D_2R/D_3R ratio in thalamus and red nucleus of human aged brains.[15,16]

Positron emission tomography (PET) neuroimaging offers a noninvasive method for investigating DR levels *in vivo* and studying receptor occupancy or changes in receptor density in neuropsychiatric diseases and drug abuse. The effective methods in ^{11}C-chemistry and ^{18}F-chemistry have successfully been applied to the syntheses of DR radioligands with high specific activities.[17] [^{11}C]-PHNO was developed by Wilson et al. for use in human PET studies [18] and was the first agonist radiotracer for D_2R/D_3R with 30–50-fold higher affinity for D_3R than for D_2R both *in vitro* [19] and *in vivo*.[20] Therefore, [^{11}C]-PHNO specific binding derives from contributions of both D_2R and D_3R, in proportions that vary across regions based on their respective densities. Despite certain limitations, using [^{11}C]-PHNO and a selective D_3R antagonist such as GSK598809 or SB-277011, an approximation can be done to dissect the total [^{11}C]-PHNO signal in each brain region, into their D_3R and D_2R components and estimate the regional fraction of the D_3R signal. For example, binding in the hypothalamus and SN gives 100% signal attributable to D_3Rs, 65%, 43% and 26% of the signal are detected in the globus pallidus, thalamus and ventral striatum, whereas binding in the dorsal striatum is near 100% D_2R specific.[21–23] These results differ from those obtained by autoradiographic methods above mentioned.[15,16]

D_3R and D_2R subtypes have been found both post- and presynaptically, and in the latter location they function as autoreceptors that regulate dopamine synthesis, metabolism and release. The two receptor subtypes share 79% amino acid sequence homology in their transmembrane regions and, more importantly, near identity of the residues inferred to form their binding site.[24] As a result, the development of ligands selective for either subtype is a challenging task.[25,26] With few exceptions, most D_3R ligands are also active in D_2R, making their use as chemical probes problematic. Fortunately, there are a series of non-selective compounds

with preferential D_3R activity (they bind *in vitro* to this receptor with an affinity at least 10-fold higher than to the other DRs) that, if dosed properly, can be used to explore D_3R-dependent pharmacology in humans.[27] Ligands that can bind at the orthosteric site of these receptors have been classified as full agonists, partial agonists, and inverse agonists and/or neutral antagonists, depending on their effects on affinity and efficacy.

From the cloning of the D_3R by Sokoloff et al. [28], much more information has become available on the pharmacology and signal transduction pathways of this receptor. Complex differences in signaling have been observed in receptors of the D_2R-like family, especially for the D_3R subtype.[1] For example, D_3Rs expressed in transfected HEK-293 cells show either low or no inhibitory effect on AC activity whereas D_2Rs induce a strong inhibition of forskolin-induced cAMP accumulation in these cells.[29] These discrepancies are due to differential expression of AC isoforms, because D_3R selectively needs the isoform V to inhibit AC activity, and this isoform is not expressed in HEK-293 cells.[30] D_3Rs also induce the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the atypical protein kinase C ζ, an effect apparently mediated by the βγ subunit of the G protein. In the MAPK pathway, ERK1/2 could be activated by HEK-293 and COS-7 cell lines when $G\alpha_o$ but not $G\alpha_i$ is co-expressed, whereas D_2R can phosphorylate ERK1/2 through both isoforms of the G protein and by the D_2R-β-arrestin complex.[31] In PKB/Akt signaling, specific activation of D_3R enhances Akt phosphorylation, which has been associated with increased dendritic arborization in DAergic neurons from mouse embryos.[32]

Chien et al. [33] reported the crystal structure of the human D_3R, in complex with the D_2R/D_3R-specific antagonist eticlopride, which occupies the core orthosteric binding site deep in the transmembrane bundle cavity. These crystal structural data make structure-based methodologies plausible for developing highly selective compounds for the D_3R and has enabled greater understanding of how dopamine modulates movement, cognition and emotion, leading, in turn, to new opportunities for the design of drugs to treat neurological disorders.[33–35] Analysis of the ligand-binding pocket structure in the D_3R revealed a second, potentially allosteric, binding site that extends toward the extracellular loop 2 and transmembranes 1, 2, 3 and 7, and which was predicted to accommodate aryl amide moieties of D_3R-selective antagonists such as R22.[33,35,36] This is in agreement with the previous prediction by Wang et al. [37] based on studies of molecular modeling to explore the intermolecular interactions of a large library of ligands with D_3R and D_2R.

2.1. Clinical relevance of full D_3R agonists

2.1.1. Parkinson's disease

The D_3R is a target of pharmacotherapeutic interest in a variety of neurological and neuropsychiatric disorders, including Parkinson's disease (PD), depression, restless leg syndrome (RLS), schizophrenia and drug addiction.[25,38–40] PD is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive loss of DAergic neurons in the SNc, causing the depletion of dopamine in the striatum and the accumulation of intracytoplasmatic inclusions known as Lewy bodies, composed mainly of α-synuclein, throughout the central, autonomic and peripheral nervous system.[41] At present, there is no effective long-term therapy for PD, although many of the motor symptoms can be treated with drugs that either replace the lost dopamine or mimic the action of dopamine in the brain, thus reducing the symptoms and making life with the disease easier. The most commonly used treatment is the administration of the dopamine precursor, L-DOPA.[42] This compound is a natural chemical that is generally administered in conjunction with benserazide or carbidopa, a peripheral decarboxylase inhibitor; the latter enables the L-DOPA to enter the brain more efficiently and prevents or lessens its side effects such as nausea, vomiting and orthostatic hypotension.[43] Long-term use of L-DOPA treatment can, however, have major motor complications, such as end-of-dose wearing-off, 'on-off' fluctuations and dyskinesias.[44] Nonetheless, dopamine agonist drugs are one of the main ways of treating Parkinson's symptoms.[45] Clinical improvements in PD produced by D_3R-preferring agonists have been related to their neuroprotective actions and to their neuroregenerative properties, suggesting that D_3Rs might be a good target for the development of more selective agents for preventing the degeneration and restoring the function of DAergic neurons in PD.[46,47]

In general, D_2-like receptor agonists fall into two major classes: ergolines, first-generation ergot alkaloids derivatives (e.g. bromocriptine, cabergoline and lisuride), and the second-generation nonergolines (e.g. pramipexole, ropinirole and rotigotine).[26,45] Cabergoline and bromocriptine are the most widely used drugs in the treatment of patients with prolactinomas, with cabergoline being preferred because of its better tolerance and feasibility of administration.[48] D_3R-preferring full agonists, such as the nonergolinic compounds pramipexole and ropinirole,[49] are extensively used in the treatment of PD, as they delay the loss of DAergic terminals upon administration to patients and provide a more continuous stimulation of DRs than does L-DOPA [45] (see Figure 1 and Table 1 and 2). Several studies have shown that pramipexole is effective as monotherapy in early PD and as adjunctive therapy in advanced disease.[50] Pramipexole extended release is a recently developed once-daily formulation approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) that has demonstrated non inferiority compared with pramipexole immediate release in the treatment of early and advanced PD.[51,52] Ropinirole has been licensed in Europe and the USA for the treatment of symptomatic PD as monotherapy and as add-on therapy to L-DOPA. Ropinirole is effective in the treatment of patients with early PD and is able to delay the onset of dyskinesia in early PD patients not optimally controlled with L-DOPA.[53] Carnicella et al. [54] showed that the nonergoline D_3R selective agonist PD-128907 reversed the motivational deficits induced by SNc DAergic lesions, providing a potential specific target for the treatment of PD-related neuropsychiatric symptoms. Riddle et al. [55] found that the acute administration of PG01042, a D_3R selective agonist/partial agonist, which binds with >39-fold higher selectivity to the D_3R than to the D_2R subtype, can attenuate the L-DOPA-associated abnormal involuntary movements in unilaterally lesioned rats. Chronic treatments with D_3R preferential DAergic agonists

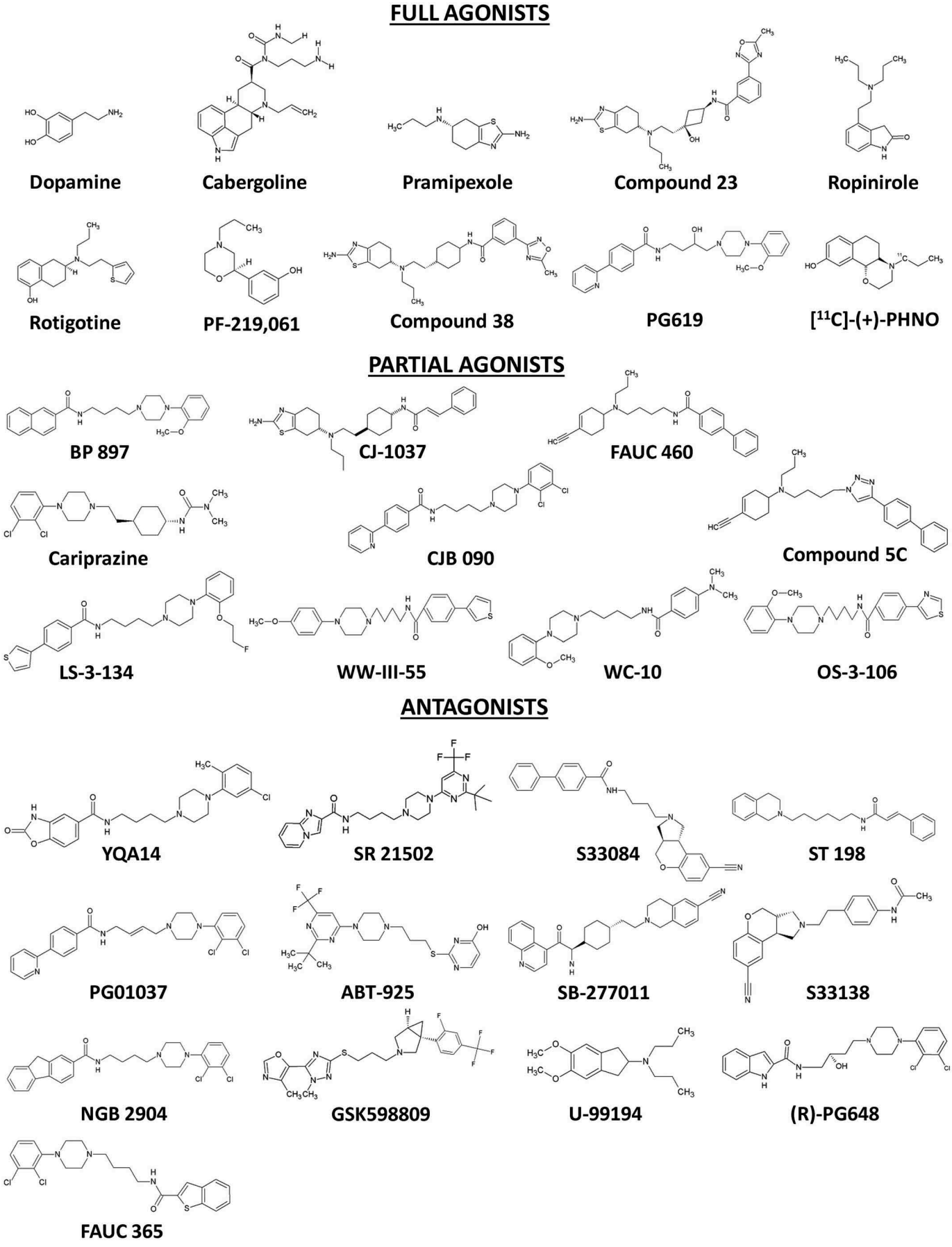


Figure 1. Chemical structure of selected D3R ligands. More information about the names, affinities and selectivities is shown in Table 2 and 3.

Table 1. Selective D_3R compounds applied in humans.

Ligand type	Compound	Brand name	Company	Affinity constant[a]	D_2R/D_3R selectivity	Clinical application	Clinical status	References
Full agonists	[^{11}C]-PHNO			0.16–0.56	25–53	*In vivo* PET studies in schizophrenia, PD and substance abuse	Several clinical trials	http://clinicaltrial.gov [19,22,57,58]
	Pramipexole	Mirapex	Boehringer, Ingelheim	0.2–16	24–800	PD, RLS	FDA 1997 approval FDA 2008 approval	http://www.accessdata.fda.gov [45,49,51,52,59]
		Pramipexole	Barr, Apotex, Mylan, Sandoz…					
	Ropinirole	Requip	GlaxoSmithKline	10–79	20–95	PD, RLS	FDA 1997 approval FDA 2008 approval	http://www.accessdata.fda.gov [49,53]
		Ropinirole	G and W, Apotex, Mylan, Sandoz, Watson…					
	Rotigotine	Neupro	UCB	0.7	19	PD, RLS	FDA 2007 approval	http://www.accessdata.fda.gov [59,60,61]
Partial agonists	Cariprazine	Vraylar	Forest Res Inst	0.09	6	Schizophrenia Bipolar disorders	FDA 2015 approval	http://www.accessdata.fda.gov [62,63,64,65]
Antagonists	ABT-925		Sponsored by Abbott	2.9	>100	Schizophrenia	Phase II	http://clinicaltrial.gov[66–67]
	GSK 598809		Sponsored by GlaxoSmithKline Sponsored by Massachusetts General Hospital	1–3	525–670	Tobacco and appetite disorders	Phase I Phase II	http://clinicaltrial.gov [57,68,69,70]
	GSK 618334		Sponsored by GlaxoSmithKline	13	54	Alcohol abuse Compulsive behavior	Phase I	http://clinicaltrial.gov[57,70,71]

[a]in nM.

were associated with a very high reduction in dyskinesia in the later stages of PD, as compared with patients treated with L-DOPA,[56] these effects being possibly mediated by the restorative action of D_3R expressed in DAergic neurons through activation of specific intracellular pathways related to cell growth.[27]

2.1.2. Restless legs syndrome

RLS (Willis–Ekbom) disease has been recognized as a neurological disorder characterized by several unpleasant sensations in the legs and an uncontrollable, and sometimes overwhelming, urge to move them.[99] RLS symptoms are circadian in nature and cause major problems for patients in the evening and at night. The FDA has approved pramipexole, ropinirole or the rotigotine transdermal patch as the first-line therapy for treating RLS (see Table 1 and 2). These drugs are generally well tolerated but can cause nausea, dizziness, gastrointestinal complaints, leg swelling, daytime sleepiness and skin reactions to rotigotine patches.[59] Pramipexole, ropinirole and other DAergic agonists used mainly to treat PD and RLS have been reported to cause impulse control disorders (ICD) such as pathological gambling, compulsive shopping, hypersexuality and compulsive or binge eating. [100] ICD can have serious personal, familial, financial, legal, social and medical consequences in the lives of patients who suffer from them. Given the potentially devastating consequences and lack of effective treatments for ICD, prevention and treatment strategies are critical.[101] Further studies are necessary to improve our understanding of the neurobiology of ICD, to minimize the risk to patients and to develop novel therapeutic approaches.[102]

2.2. Clinical relevance of D_3R partial agonists and antagonists

Partial agonists have a lower intrinsic activity at their receptors than do full agonists, allowing them to act either as a functional agonist or a functional antagonist, depending on the surrounding levels of naturally occurring full agonist.[103] D_2R / D_3R partial agonists provide a novel means for the treatment of schizophrenia that would be better than existing drugs; they would display agonist-like activity in brain areas or at times when dopamine is hypofunctional, but would act as antagonists during a hyper-DAergic state.[104]

Many research groups have developed D_3R-selective partial agonists and antagonists [25,105–107] (see Figure 1 and Table 2 and 3). However, it has been difficult to design compounds that lack interactions with other monoaminergic receptors, most of which have considerable molecular homology to DRs. These interactions often include serotoninergic, muscarinic, adrenergic, and histaminic receptors. A 'general' pharmacophore for D_3R antagonists was first described in an interesting review by Hackling and Stark.[254] The main pharmacophore features observed in these scaffolds are: (i) an aromatic region; (ii) an H-bond acceptor (frequently depicted by a carbonyl group; (iii) a linker/spacer region of the appropriate length; (iv) a basic nitrogen group; and (v) another aromatic region. Initially, the prototypic compound used to depict the minimal pharmacophore of D_3R antagonists was

Table 2. Affinity[a] of selected D_3R full agonists and partial agonists and selectivity D_3R vs. D_2R.

Agonist type	Compound	D_3R	D_2Rl[b]	D_2R/D_3R	D_4R	D_1R	Research group (year)	Ref.
Full agonist	Dopamine	3	16	5.3	6.4		Sergi Ferré (2016)	[72]
		3.2	200	62	79		Michel Gillard (2015)	[60]
		69	146	2.1		2730	Peter Riederer (2003)	[73]
		40	794	20	794		Derek N. Middlemiss (1999)	[74]
		1.8	6.2[c]	3.4	18		Mark A. Scheideler (1997)	[75]
		29	710	24			Stephen B. Freedman (1994)	[19]
	Cabergoline	1.3	1.6	1.3	56	1462	Peter Riederer (2003)	[73]
		0.8	1.0	1.25		214	Mark J. Millan (2002)	[49]
	Apomorphine	4	10	2.5	4		Michel Gillard (2015)	[60]
		26	83	3.2	4.4	370	Mark J. Millan (2002)	[49]
		9.5	41[c]	4.3	6.5		Mark A. Scheideler (1997)	[75]
		16	30	1.9			Stephen B. Freedman (1994)	[19]
	PD-128,907	2	500	250			Mark J. Millan (2000)	[76]
		7.1	5300	745			Josée E. Leysen (1999)	[77]
		0.4	202[c]	505	114		Mark A. Scheideler (1997)	[75]
		1.1	1183	1000	7000		Alexander van Vliet (1996)	[78]
		1.7	197	116	270		Stephen B. Freedman (1995)	[79]
	Quinpirole	2	316	158	25		Michel Gillard (2015)	[60]
		182	4000	22			Robert R. Luedtke (2012)	[80]
		24[d]	63[d]	2.6	1.8[d]		Peter Gmeiner (2005)	[81]
		42	1445	34	34	>10000	Mark J. Millan (2002)	[49]
		1.2	80[c]	67	14		Mark A. Scheideler (1997)	[75]
		17	600	35			Stephen B. Freedman (1994)	[19]
	Rotigotine	0.1	2	20	20		Michel Gillard (2015)	[60]
		0.71	13.5	19	15	83	Dieter Scheller (2009)	[61]
	Pergolide	0.86	37	43		447	Peter Riederer (2003)	[73]
		5.5	26	4.7	59	340	Mark J. Millan (2002)	[49]
		1.6	7.9	5	126		Derek N. Middlemiss (1999)	[74]
	Pramipexole	0.25	200	800	63		Michel Gillard (2015)	[60]
		0.88[d]	21[d]	24	8.1[d]		Peter Gmeiner (2005)	[81]
		0.97	473	488		>10000	Peter Riederer (2003)	[73]
		10	1700	170	130	>10000	Mark J. Millan (2002)	[49]
		12.6	794	63			Mark J. Millan (2000)	[76]
		16	1000	63	400		Derek N. Middlemiss (1999)	[74]
	Ropinirole	10	398	40	250		Michel Gillard (2015)	[60]
		36	690	19			Mark J. Millan (2009)	[82]
		35	3277	94		>10000	Peter Riederer (2003)	[73]
		79	1580	20	3980		Derek N. Middlemiss (1999)	[74]
	(R)-trans-7-OH-PIPAT	0.1r	0.7r	7			Perry B. Molinoff (1994)	[83]
	5-OH-DPAT	0.54	6	11	47		Alexander van Vliet (1996)	[78]
		1.36r	59r	43			Aloke K. Dutta (2010)	[84]
	7-OH-DPAT	0.79	79	100			Michel Gillard (2015)	[60]
		2.35	202	86			Aloke K. Dutta (2008)	[38]
		2.5	100	40			Mark J. Millan (2000)	[76]
		0.57	56	98	110		Alexander van Vliet (1996)	[78]
		1.6	60	37			Stephen B. Freedman (1994)	[19]
	Talipexole	100	1585	16	6300		Derek N. Middlemiss (1999)	[74]
		68	977	14	331	>10000	Mark J. Millan (2002)	[49]
	PHNO	0.16	8.5	53			Stephen B. Freedman (1994)	[19]
	[^{11}C]-(+)-PHNO[e]	0.45 m	12.5 m	28			Eugenii A. Rabiner (2012)	[20]
	TL-99	2.5	68	27	58	2700	Mark J. Millan (2002)	[49]
	FAUC 54[d]	5.3	52	9.8	32		Peter Gmeiner (2005)	[81]
	FAUC 73[d]	5.2	270	52	22		Peter Gmeiner (2004)	[252]
	FAUC 88[d]	3.2	94	29	6.3		Peter Gmeiner (2005)	[85]
	Quinelorane	6.3	250	40			Mark J. Millan (2000)	[76]
		5.3	710	134	19	>10000	Mark J. Millan (2002)	[49]
	PF-592,379	215	>10000	>45	4165	>10000	Gregory T. Collins (2012)	[86]
	8-OH-PBZI	27	1770[c]	66	276		Mark A. Scheideler (1997)	[75]
	Compound (-) 10	0.35	25.2	72			Aloke K. Dutta (2008)	[38]
	(R,R)-S32504	15	1200	80			Mark J. Millan (2009)	[82]
	PG619[f]	2.8	284	100			Amy H. Newman (2007)	[87]
	D-301	2.2	269	122			Aloke K. Dutta (2012)	[88]
	Compound trans-7	0.18	38	212	>850		Marcello Leopoldo (2006)	[89]
	D-264	0.92	264	290			Aloke K. Dutta (2012)	[88]
	Compound 52	0.38r	170r	450		17400r	Shaomeng Wang (2012)	[90]
	Compound 38	0.73r	359r	490		9937r	Shaomeng Wang (2012)	[90]
	D-440	1.84	1073	583			Aloke K. Dutta (2012)	[88]
	Compound (-) 45	1.1	902	820			Aloke K. Dutta (2012)	[88]
	CJ-1639	3.6	>3600	>1000		>3600	Shaomeng Wang (2011)	[91]
		0.5r	2568r	5140		10100	Shaomeng Wang (2011)	[91]
	PF-219,061[g]	8	>10000	>1250			Julian Blagg (2007)	[34]
	Compound 23	0.53	15800	29800		15000	Shaomeng Wang (2014)	[92]
Partial agonist	Cariprazine	0.085	0.49	5.8			Béla Kiss (2010)	[63]
	WC-10	0.8	34	43	900		Robert H. Mach (2005)	[93]

(*Continued*)

Table 2. (Continued).

Agonist type	Compound	D_3R	D_2RI^b	D_2R/D_3R	D_4R	D_1R	Research group (year)	Ref.
	[^{3}H]WC-10	1.2	79	66			Robert H. Mach (2009)	[94]
	CJB 090	0.5	24.8	50			Amy H. Newman (2007)	[87]
	D-74	1.6	142	91			Aloke K. Dutta (2008)	[38]
	OS-3–106	0.23	26	115			Janet L. Neisewander (2013)	[95]
	LS-3–134	0.17	27.7	163	246		Robert H. Mach (2011)	[10]
	FAUC 346	0.23	87	378	15		Peter Gmeiner (2002)	[96]
	CJ-1037	0.41r	330r	805		13000r	Shaomeng Wang (2008)	[97]
	WW-III-55	19.8	17100	862			Janet L. Neisewander (2013)	[95]
	FAUC 460[d]	0.011	40	3640	4.3		Peter Gmeiner (2008)	[98]
	Compound 5 c[d]	0.11	610	5550	190		Peter Gmeiner (2008)	[98]

[a]in nM for human DR (except when indicated: m: monkey, r: rat).
[b]Dopamine D_2-long receptor.
[c]Dopamine D_2-short receptor.
[d]High-affinity binding site.
[e]K_d/f_{ND} values.
[f]Antagonist in mitogenesis assays.
[g]EC_{50} values.

Table 3. Affinity[a] of different D_3R antagonists and selectivity D_3R vs. D_2R.

Selectivity[b]	Compound	D_3R	D_2RI^c	D_2R/D_3R	D_4R	D_1R	Research group (year)	Ref.
Mixed selectivity	Nemonapride	0.053	0.017	0.3	0.214		Tokio Yamaguchi (1996)	[109]
		0.05	0.03r	0.6	0.03r		Karen L. O'Malley (1994)	[110]
		0.38	0.22	0.6			Josée E. Leysen (1999)	[77]
	Raclopride	3.5	1.8	0.5	2400	18000	Lars Gawell (1985)	[111]
		1.03	0.595	0.6	1610		Tokio Yamaguchi (1996)	[109]
		1.8	1	0.6	2400	>72000	Asa Malmberg (1993)	[112]
		2.77	4.97	1.8			Josée E. Leysen (1999)	[77]
		1.4	1.1	0.8			Mark J Millan (1995)	[113]
	(-)Sulpiride	8.0	6.0	0.7			Stephen B Freedman (1994)	[19]
		8.0	7.4	0.9			Asa Malmberg (1993)	[112]
		12.5	10.4	0.8			Yoshihiro Tadori (2011)	[114]
	Amisulpiride	3.0	0.97	0.3			Asa Malmberg (1993)	[112]
		3.2	2.8	0.9	>1000	>1000	Hans Schoemaker (1997)	[115]
		2.38	1.76	0.7			Yoshihiro Tadori (2011)	[114]
	Eticlopride	0.15	0.18	1.2	107		Robert R. Luedtke (2014)	[116]
		0.16r	0.50r	3.1			Michael A Nader (1999)	[117]
	AJ76	70	155	2.2	214		Mark J Millan (1995)	[113]
	UH232	4.65	13.4	2.9	89.4		Tokio Yamaguchi (1996)	[109]
		7	28	4	144		Mark J Millan (1998)	[118]
	DS121	249	1140	4.6			Clas Sonesson (1994)	[119]
Moderate selectivity	Nafadotride	0.81	5	6.2	269		Mark J Millan (1998)	[118]
		0.31	3	9.7	1780	890	Jean C Schwartz (1995)	[120]
	U99194	223	2281	10	>10000		Mark J Millan (1998)	[118]
	S14297	13	297	23	1380		Mark J Millan (1995)	[113]
	S33138	2.1	74	35	>10000		Mark J Millan (2008)	[121]
High selectivity	ST198	12	724	60			Eberhard Schlicker (2001)	[246]
		12	780	65	5000	25000	Erwan Bézard (2003)	[247]
	GR218231	1.1	66	60			Mark J Millan (2000)	[248]
	GR103691	0.4	24	60	81		Mark J Millan (1998)	[118]
	KKHA-761	3.85	270	70	154		Woo-Kyu Park (2005)	[249]
	KCH-1110	1.3	119	92	6.4		Woo-Kyu Park (2003)	[122]
	(S)-BAK 2–66	29	2500	86	>14000		Amy H Newman (2014)	[123]
	SB-277011	11	1047	95			Charlie Reavill (2000)	[124]
		11r	2818r	256			Charlie Reavill (2000)	[124]
		8r	4680r	585			Béla Kiss (2008)	[125]
	SB-414796	4	400	100			Gregor J Macdonald (2003)	[250]
	Compound 16	0.12	13	107			Amy H Newman (2015)	[126]
	S33084	0.26	29	112			Mark J Millan (2000)	[248]
		0.32	32	99			Mark J Millan (1999)	[127]
	(R)-BAK 2–66	6.9	800	116	>9000		Amy H Newman (2014)	[123]
	ABT-925	2.9	351	120			Hervé Geneste (2006)	[128]
	SR21502	4.2	511	122			Robert Ranaldi (2014)	[129]
	Y-QA31[d]	1.7	220	126	877	>10000	Jin Li (2016)	[130]
	PG01037	0.7	93	133	375		Amy H Newman (2007)	[87]
		0.7	82	117	505		Amy H Newman (2012)	[39]
	YQA14	2.11[e]	335	158			Jin Li (2012)	[131]
		3	47	15	2370		Amy H Newman (2015)	[132]
	PG723	1.4	249	178	1920		Amy H Newman (2009)	[133]
	Compound 35	1.6	316	198			Christian Heidbreder (2007)	[251]
	RG-15	0.03	5.9	197			Béla Kiss (2008)	[125]
		0.38r	24r	63			Béla Kiss (2008)	[125]

(*Continued*)

Table 3. (Continued).

Selectivity[b]	Compound	D_3R	D_2RI[c]	D_2R/D_3R	D_4R	D_1R	Research group (year)	Ref.
Very high selectivity	(S)-PG648	3.9	790	202	1900		Amy H Newman (2014)	[123]
	CJ-1882	2.8	623	222			Shaomeng Wang (2014)	[134]
		2.7r	>300000r	>100000			Shaomeng Wang (2014)	[134]
	GCC 3–09	0.9	217	236	2040		Amy H Newman (2015)	[132]
	NGB 2904	0.23	54.7	235	3670		Amy H Newman (2015)	[132]
		2.7	698	259			Amy H Newman (2005)	[135]
		1.1m	911m	828			Amy H Newman (2001)	[136]
		1.4	217	155			Andrew Thurkauf (1998)	[137]
		2	112	56			Amy H Newman (2005)	[253]
	AVE 5997	5.1	1470	288			Min Zhang (2006)	[138]
	(R)-PG648[f]	1.12	433	387	3430		Amy H Newman (2009)	[133]
		0.53	300	566	4000		Amy H Newman (2014)	[123]
	GSK598809	3.15	2110	670	35600		Amy H Newman (2015)	[132]
	FAUC 365	0.5	3600	7200	340		Peter Gmeiner (2002)	[96]

[a]in nM for human DR (except when indicated: m: monkey, r: rat).
[b]Selectivity classification of human receptors.
[c]Dopamine D_2-long receptor.
[d]IC_{50} values.
[e]Low-affinity binding site.
[f]Antagonist and weak partial agonist.

the partial agonist BP 897.[108] However, this pharmacophore similarly fit both antagonists and partial agonists and it could not provide hints for achieving selectivity over the D_2R.[107]

Several research groups have optimized these lead compounds using small-molecule structure-activity relationships studies,[39,107,108] structure-based drug design, molecular dynamics and molecular pharmacology to design novel molecules.[25,33,36,139,140] One common template used to develop D_3R -selective partial agonists and antagonists with drug-like physicochemical properties incorporates two pharmacophores, a substituted 4-phenylpiperazine and an extended aryl ring system, connected through a butylamide linker chain in which the amide function is necessary for maximal D_3R over D_2R selectivity.[253,141]

Medicinal chemistry efforts have led to the development of several D_3R-preferring antagonists with high binding affinity (K_i<10 nM) and >100-fold higher selectivity vs. the closely related D_2Rs (Table 3). However, several of these compounds, such as SB-277011 and NGB 2904, have low bioavailability, poor water solubility and high lipophilicity. Several subsequent modifications of the original pharmacophores have allowed the identification of newer antagonists endowed with reduced lipophilicity and increased water solubility and metabolic stability, examples being PG01037, PG648, SR21502 and YQA14.[106,129,133,142,143] Furthermore, excellent levels of potency and selectivity have been achieved with compounds reaching 400-fold and >1000-fold higher selectivities (Table 3). Furman et al. [144] indicated that the enhanced affinity of the 4-phenylpiperazine derivatives D_3R-selective antagonists is due to binding at both the orthosteric binding site (OBS; the 4-phenylpiperazine moiety) and a secondary binding pocket (SBP; the extended aryl amide moiety). The efficacy of these compounds depends on the binding mode in the OBS, whereas the interaction of the aryl amide moiety in the SBP induces conformational changes in the transmembrane segment 2 (TM2) and the extracellular loop 1, which are critical determinants for D_3R over D_2R selectivity.[35,36]

2.2.1. Schizophrenia

Several lines of evidence indicate that D_3Rs play an important role in the pathophysiology of schizophrenia.[145,146] Cariprazine is an orally active and potent D_2R/D_3R partial agonist with preferential binding to D_3Rs (Figure 1 and Table 1 and 2). Relative to other atypical antipsychotic agents, cariprazine binds with significantly (six- to eightfold) higher affinity to D_3R versus D_2R.[63] Cariprazine antagonizes DRs when they become overstimulated, but agonizes the same receptors when an individual has low dopamine levels. The efficacy of cariprazine in maniac or mixed/maniac states of bipolar I disorder has been demonstrated in phase III clinical trials,[62] and this drug was approved by the FDA on September 2015 for the treatment of schizophrenia and mania associated with bipolar disorder.[64] Cariprazine has proven to be safe, tolerable and effective in clinical trials and induces extrapyramidal symptoms less often than do other antipsychotics. The most commonly encountered adverse events include akathisia, insomnia, nausea, dizziness and constipation.[65]

In contrast to D_2R antagonists, several D_3R antagonists (S33084, S33138, SB-277011) (see Figure 1 and Table 3) positively influence a variety of social and cognitive behaviors in rodents, including tests representing cognitive flexibility and executive function, both of which are impaired in schizophrenia patients.[147,148] However, the therapeutic efficacy of D_3R antagonism in schizophrenia has yet to be confirmed. Only the selective D_3R antagonist ABT-925 (see Table 1) has reached clinical phase II in patients with acute exacerbation schizophrenia, although in the regimens used this antagonist did not significantly improve schizophrenia symptoms in these patients.[66] A PET study has revealed that these regimens resulted in <60% receptor occupancy of ABT-925 at the D_3R, suggesting that the hypothesis of D_3R antagonism for the treatment of schizophrenia may not have been fully tested.[67] Based on mechanistic and experimental considerations and due to the fact that D_3R antagonism can inhibit

extrapyramidal symptoms and produce neither anhedonia nor metabolic adverse effects, Gross et al. [146] argued that the development and clinical testing of newer D_3R antagonists with high potency at D_3Rs, enabling sufficient receptor occupancy, is highly warranted.

2.2.2. Substance abuse

The D_3R has long been a target of interest in addiction pharmacotherapy due to its relatively focal localization in mesolimbic regions (see above), its enhanced expression in drug-exposed brains and because selective D_3R antagonists show promise for the treatment of substance use disorders. [39,106,126,135,149] Craving, or the strong desire to use an abused substance, is a key component of drug addiction and a motivator for drug use. The most challenging aspect of treatment of drug addiction is the relapse that occurs after a period of abstinence. Results from many clinical studies suggest that drug relapse and craving are often provoked by acute exposure to the self-administered drug or related drugs, drug-associated cues or contexts, or certain stressors. D_3Rs are implicated in relapse to drugs and one of the most consistently reported effects of D_3R antagonists is their ability to block reinstatement of drug-seeking behaviors,[255,150–152] suggesting that these compounds may be useful as pharmacological treatments in preventing relapse to drugs and reducing craving in humans.[68] D_3R antagonists and partial agonists have shown especially promising results in rodent models of relapse-like behavior, including stress-, drug- and cue-induced reinstatement of drug seeking. However, translation to human studies has, to date, been limited.[132]

2.2.2.1. Tobacco. Tobacco smoking is a harmful habit that can be targeted to bring down both morbidity and future health care costs. Both nicotinic acetylcholine receptor (nAchR)-based and non-nAChR-based smoking cessation strategies are under various stages of development.[153] The reinforcing effects of nicotine are partly mediated by the activation of dopamine neurons in the VTA and the release of dopamine in the ventral striatum and NAc.[154] A selective increase in D_3R binding and D_3R mRNA has been found in the shell of the NAc of nicotine-treated rats, without any significant changes in the expression of D_1R and D_2R,[155,156] suggesting that normalizing the D_3R function by D_3R ligands may be a novel strategy for the treatment of smoking addiction.[156] Le Foll et al. [157] suggested that D_3R ligands such as the D_3R-preferring partial agonist BP 897 reduces the motivational effects of nicotine by a mechanism distinct from nicotine replacement therapy and distinct from blocking the uptake of synaptic dopamine through the dopamine transporter.[153] Khaled et al. [151,158] showed that the D_3R antagonist SB-277011, but not the partial agonist BP 897, blocks cue-induced reinstatement of nicotine-seeking, supporting a potential role for using selective D_3R antagonists for the prevention of relapse to smoking. There are two novel D_3R-selective antagonists, GSK618334 and GSK598809 (see Table 1 and 3), which have entered phase I and phase II clinical trials, respectively, for the treatment of drug addiction, including nicotine dependence.[71] Previous research has shown that GSK598809 has good physicochemical and pharmacokinetic properties; it was deemed to be safe and well tolerated in healthy volunteers and significantly attenuates the expression of conditional place preference to nicotine.[68,69,151] A recent study using GSK598809 and [^{11}C]-PHNO sought to predict the ability of this antagonist to reduce nicotine-seeking/craving behavior in human cigarette smokers, as well as to examine its capacity of D_3R occupancy. The results obtained suggest that GS598809 binds to D_3R in a dose-dependent manner and support further investigation of this antagonist for smoking cessation in human subjects.[25,68]

2.2.2.2. Alcohol. The mesolimbic dopamine pathway plays an integral role in the reinforcing properties of many drugs of abuse, including alcohol.[245,159] Rice et al. [159] showed, in mice, that the selective blockade of the D_3R by a low dose of the preferential D_3R antagonist S33138 significantly decreases ethanol binge-drinking but does not significantly alter the consumption of water. Leggio et al. [160] demonstrated that D_3R is necessary for ethanol consumption in mice. Both U99194A and SB-277011 D_3R antagonists induced a significant decrease in voluntary alcohol intake in wild-type but not in D_3R deficient mice. Moreover, buspirone, an already approved drug for anxiety disorders, endowed with D_3R/D_2R antagonistic activity (Ki D_3R = 29 nM; Ki D_2R = 62 nM), proved to be effective in inhibiting ethanol intake.[160] This pharmacological evidence is consistent with rat data showing that D_3R antagonism reduces relapse-like drinking and cue-induced alcohol-seeking behavior.[255] Evidence from animal studies supports a role for the D_3R in alcohol reinforcement or liking. Selective D_3R antagonism has been shown to reduce ethanol preference and consumption in alcohol-preferring and non-preferring rats.[161] Dopamine signaling through D_3R is essential for ethanol-related reward and consumption and may represent a novel therapeutic target for weaning.[160] Recently, Bahi and Dreyer,[162] using pharmacological and genetic approaches, reported that the D_3R is an essential component of the molecular pathways underlying the reinforcing properties of alcohol in rats. Erritzoe et al. [70] found increased binding of the D_3R-preferring agonist [^{11}C]-PHNO in the hypothalamus of alcohol-dependent human patients, a region involved in the control of opioid neurotransmission that is a key modulator of the DAergic mesolimbic pathway. Given the high level of D_3R in the hypothalamus and the fact that around 90% of this [^{11}C]-PHNO signal reflects D_3R,[57] it is likely that this receptor contributes to this observed experimental effect. This may be relevant to the development of future therapeutic strategies to treat alcohol abuse.[70]

2.2.2.3. Cocaine. The D_3R system has recently attracted considerable attention as a target for developing drugs with clinical interest for the treatment of substance use disorders. D_3R antagonists and partial agonists have shown promising results in non-human primate and rodent models.[132] Cocaine is an addictive, psychoactive and stimulant drug that can cause both physiological and physical dependence, and chronic use of cocaine appears to lead to dysregulation of the brain DAergic system. D_3Rs have been implicated as potential pharmacotherapeutic targets for cocaine addiction due to their selective distribution in brain circuits where

reward-related learning induced by cocaine occurs, and also because of their involvement in the behavioral effects of cocaine.[106,129] In contrast to the D_2R subtype, the D_3R is apparently up-regulated following chronic stimulant abuse.[163] Post-mortem human studies have shown that D_3Rs are up-regulated in the NAc of the brain of cocaine overdose victims.[164] It is thought that the mechanisms underlying D_3R upregulation result from repeated stimulation of D_1Rs on GABAergic neurons during cocaine use,[165] leading to release of brain-derived neurotrophic factor, which has been linked to increased D_3R expression [166] and was shown to be elevated in cocaine dependence in humans.[167] Recent PET studies using the D_3R-preferring [^{11}C]-PHNO have demonstrated an increase in D_3R expression in the SN, in the hypothalamus and, possibly, in the amygdala of the brain of cocaine-dependent humans compared with healthy controls. These results suggest that D_3R elevation may be a consistent and predictive biomarker for addiction, with potential use for clinical innovation.[58]

It has been hypothesized that during cocaine self-administration, when extracellular dopamine levels are high, a partial agonist would compete with the endogenous agonist for binding to the receptor, mitigating the effects associated with cocaine abuse. When extracellular dopamine levels are low, such as during withdrawal, a partial agonist could compensate the low dopamine tone, normalizing dopamine function and reducing craving.[168] In addition, partial agonists may have lower abuse liability than full agonists and fewer side effects than antagonists.[135] In cocaine discrimination studies, pretractament of monkeys with the D_3R partial agonist CJB 090 attenuated the discriminative stimulus effects of cocaine at a dose that did not induce adverse side effects.[169] Recently, two novel ligands OS-3–106 and WW-III-55 (see Figure 1 and Table 2) were identified as D_3R partial agonists with >100-fold D_3R vs. D_2R selectivity; these drugs attenuated cocaine self-administration which point to D_3R as a feasible target for reducing cocaine-related behavior.[95] Cheung et al. [170] also showed that D_3R-selective agonists, WC-26 and WC-44 (Table 2), selectively increased response latency for cocaine but not for sucrose in rats, suggesting that motivation for cocaine may be reduced with D_3R occupancy.

Recently, there has been a strong focus on the development of D_3R antagonists as potential pharmacological treatments for cocaine addiction.[129,171] Selective D_3R blockade with the potent antagonists SB-277011 and NGB 2904 (see Figure 1 and Table 3) attenuates cocaine-enhanced brain stimulation reward, cocaine-induced place preference, drug self-administration and stress-triggered reinstatement of drug-seeking behavior in rats.[172,173] In addition, both antagonists inhibit cocaine cue-induced reinstatement of drug-seeking behavior and the compound SB-277011 inhibits cocaine cue-induced drug-seeking under second-order reinforcement.[150,174] Systemic administration of NGB 2904 had no effect on stable maintenance of cocaine self-administration, but it did attenuate the rewarding effect of cocaine and selectively inhibited relapse to drug-seeking behavior, with no apparent rewarding, aversive or locomotor effects.[175] These authors reported that microinjections of SB-277011 into the central amygdala and the NAc, but not in the dorsal striatum or the basolateral amygdala, significantly inhibited contextual cue-induced cocaine seeking in a dose-dependent manner, suggesting that D_3Rs in these brain regions play an important role in the incubation of cocaine craving in rats.[176] To date, SB-277011 is the best characterized D_3R antagonist in animal models of drug addiction, although its potential use in humans is precluded by pharmacokinetic and toxicity problems.[250] Song et al. [131,143] reported a new D_3R antagonist, YQA14, which displays similar or higher affinity and selectivity than does SB-277011 for D_3R over D_2R (see Figure 1 and Table 3); it also has improved oral bioavailability, longer half-life and better pharmacodynamic properties. Systemic administration of YQA14 significantly inhibited cocaine self-administration under both fixed-ratio and progressive-ratio reinforcement conditions, but had no effect on oral sucrose self-administration and locomotor activity.[131] The same authors [143] showed that YQA14 attenuates cocaine rewarding effects, facilitates extinction from drug-seeking behavior in rats, inhibits cocaine- or cue-induced relapse to drug-seeking behavior, and attenuates cocaine-induced behavioral sensitization. In addition, YQA14 did not induce or maintain self-administration in either naive rats or in rats experienced at cocaine self-administration, suggesting that this antagonist might be a promising agent for the treatment of cocaine addiction.[143]

Most of the currently available D_3R antagonists possess suboptimal physicochemical properties, metabolic instability and poor bioavailability, precluding their use as effective pharmacological treatments.[126] Ligands incorporating nitrogen-containing heterocycles at both ends of the molecule were pursued as an approach to discover compounds possessing D_3R binding selectivity, optimal lipophilicity and developability characteristics.[129] Galaj et al. [129] reported a new ligand, SR21502, possessing a favorable profile compared with other standard ligands and displaying good affinity at the D_3R, with >120-fold higher binding selectivity over the D_2R (see Table 3). This compound is a novel and selective D_3R antagonist that decreases cocaine reward, cocaine-seeking and cocaine-induced locomotor activity at doses that have no effect on food reward or spontaneous locomotor activity in rats.[129] In addition, it has been shown that treatment with SR21502, in the presence of cocaine cues, can facilitate extinction of cocaine-conditioned place preference, which further suggests that this compound may have potential as an anti-cocaine addiction treatment.[129] The treatment with GSK598809, in the presence of cocaine, demonstrated unacceptably high increases in blood pressure in a toxicity study in dogs, which has led to its discontinued development toward cocaine abuse treatment and may suggest that all D_3R antagonists are not an acceptable treatment avenue for drugs that by themselves increase blood pressure, e.g. cocaine, as the kidney has a lot of D_3R.[177] Boateng et al. [126] recently reported a new series of D_3R selective 4-phenylpiperazines with improved metabolic stability, in particular compound 16 (Ki = 0.12 nM) and compound 32 (Ki = 0.35 nM), as compared with the parent compound PG648. In addition, compound 16 and the classical selective antagonist SB-277011 were effective in reducing self-administration of heroin in wild-type but not in D_3R knockout mice. Recent studies have demonstrated that D_3R

selective antagonists may also be useful drugs for the treatment of methamphetamine dependence.[152,178]

3. Dopamine D3 receptors can form active homomers and heteromers as pharmacological targets

GPCRs are the largest class of molecules involved in signal transduction across cell membranes and represent major targets in the development of novel drug candidates in all clinical areas.[179,180] The long-perceived notion that GPCRs only function in monomeric form [181,182] has recently been superseded by the description of a number of GPCRs of classes A, B and C found as homodimers, heterodimers and higher-order oligomers, even in native tissues.[183–190] Irrespective of the GPCR family, homodimers seem to be a predominant species with respect to monomers, with the potential for dynamic formation of higher-order oligomers, particularly tetramers.[191,192] Dimerization can alter not only the ligand binding and active conformation of the receptors but also the interaction with different effector proteins. A receptor heteromer is a macromolecular complex composed of at least two receptor units with biochemical properties that are demonstrably different from those of its individual components.[185] Heterodimerization may have important consequences in terms of receptor function, because significant changes in receptor activation, maturation, ligand binding, signaling and trafficking have been observed for several heterodimers.[184,187,193–195] In the context of homo-and heteromers, allosteric mechanisms are responsible for many of their unique pharmacological properties.[187,196] Three major allosteric modulations appear in GPCR oligomers.[197] First, the binding of a ligand to an allosteric site can modify the intrinsic efficacy and/or affinity of any ligand binding to the orthosteric site in any protomer of the oligomer. Second, the binding of a ligand to the orthosteric site of one protomer in the receptor oligomer can modify the affinity and/or intrinsic efficacy of ligands for the orthosteric site of the partner receptor, with intrinsic efficacy being the power of an agonist to induce a functional response, independently of its affinity for the receptor.[187,196,198,199] Third, ligand-independent allosteric modulation occurs when one of the receptors in the oligomer acts as a modulator of the pharmacological properties of the other molecularly different receptor; in this case the modulator is not a ligand but a protein.[187,200] Like many other GPCRs, DRs can function as oligomers and all subtypes are capable of forming homodimers and/or heterodimers in transfected cell lines. Because overexpression of receptors in heterologous systems may lead to erroneous conclusions, the results obtained with these systems must be confirmed in cells expressing endogenous levels of receptor and in tissues (see Table 4).

Table 4. Evidence for D_3R oligomerization.

Oligomer	Experimental approach	Sample	References
D_3R–D_3R	IS	Primate and rat brain	[201]
	CM, Co-IP	HEK cells	[202]
	MM, SDM, HTRF	HEK cells	[203]
	HTRF	HEK cells	[204]
	PAB	HEK cells	[205]
$A_{2A}R$–D_3R	CM, FRET, PAB	HeLa and CHO cells	[206]
D_2R–D_3R	Co-IP, SDM, PAB	COS cells	[207]
	HTRF	HEK cells	[204]
	PAB, PAF	COS cells	[208]
	SDM, PAB, PAF	COS cells	[209]
	CM	Rat brain	[210]
D_1R–D_3R	BRET, FRET	HEK cells	[211]
	PAB	Sheep striatum	[211]
	$BRET^2$, PAF, Co-In	HEK cells	[212]
	Co-IP	Rat striatum	[212]
	Co-IP, PAB	Rat SNr	[213]
	BiFC, BiLC, PAF	HEK cells	[214]
	CODA-RET, TMp		
	Ba	*In vivo* mice	[215]
	PLA, PAB	Rat and monkey striatum	[216]

Ba: behavioral assays; BiFC: bimolecular fluorescence complementation; BiLC: bimolecular luminescence complementation; BRET: bioluminescence resonance energy transfer; CM: confocal microscopy; CODA-RET: complemented donor-acceptor resonance energy transfer; Co-In: cointernalization; Co-IP: coimmunoprecipitation; FRET: fluorescence resonance energy transfer; HTRF: homogeneous time-resolved fluorescence; IS: immunostaining; MM: molecular modeling; PAB: pharmacological allosteric effects detected by binding assays; PAF: pharmacological allosteric effects detected by functional assays; PLA: proximity ligation assay; SDM: site-directed mutagenesis; TMp: transmembrane peptides.

3.1. D_3R-D_3R homomers

Combining bioluminescence/fluorescence complementation and resonance energy transfer, Guo et al. [217] demonstrated that in living mammalian cells the D_2R is organized in a unit comprised of at least four protomers. In this structure, interactions occur both between residues from the TM4 and TM5 and through residues at the extracellular site of TM1 and residues from helix 8. Using a functional complementation assay, D_2R homodimers with a single G protein were found to be a minimal signaling unit, which is maximally activated by agonist binding to one of the protomers, whereas additional agonist or inverse agonist binding to the second protomer blunts or enhances signaling, respectively.[218] Nimchinsky et al. [201], using immunostaining with D_3R-specific antibodies, showed that D_3Rs from human, monkey and rat brains can form higher-order (homodimeric and homotetrameric) structures. This conclusion is based primarily on the identification of D_3R antibody-reactive polypeptides that migrate on gels at the positions expected for multimers of the D_3R core protein. Immunostaining with D_3R- and D_3Rnf-specific antibodies has revealed overlap in the distribution of D_3R and D_3Rnf polypeptides within cortical pyramidal neurons of monkey and rat brain, suggesting the existence of heterooligomeric complexes containing D_3R and the truncated D_3Rnf protein. The D_3Rnf is a splice variant that has been showed to be present in brain regions of schizophrenic patients lacking the D_3R mRNA transcripts.[219] The D_3R/D_3Rnf mRNA ratio increased in ventral striatum, prefrontal cortex and hippocampus after 6 h treatment with the antagonist NGB 2904, providing evidence for an adaptive response to altered D_3R stimulation involving changes in D_3R alternative splicing.[220] Karpa et al. [202], using a combination of confocal laser microscopy and coimmunoprecipitation techniques, provided direct biochemical evidence that D_3Rs are capable of forming homodimers. Furthermore, immunoprecipitation analysis indicates that physical interaction between D_3R and the D_3Rnf can also occur, forming D_3R-D_3Rnf heterodimers. As a result of this

interaction, D_3Rs no longer appear to be capable of trafficking to the plasma membrane. Instead, D_3R and D_3Rnf showed a similar, predominantly cytosolic, localization. The fact that D_3R and D_3Rnf can be coimmunoprecipitated from doubly transfected cells suggests that the physical interaction of D_3R and D_3Rnf polypeptides is the mechanism that underlies the failure of D_3R to traffic to the plasma membrane.[202]

In a recent study using a combination of molecular modeling, based on a high-resolution structure of the human D_3R, [33] site-directed mutagenesis and homogeneous time-resolved FRET, Marsango et al. [203] reported that the two D_3R protomers in the homodimer can interact through, at least, two distinct interfaces: the first one comprised by residues from TM1 and TM2 as well as helix 8 and the second one involving residues from TM4 and TM5. These authors suggested not only the capability of D_3Rs to form dimers but also a quaternary tetrameric structure, in a rhombic arrangement of the protomers, in which two TM1-TM2 helix 8 dimers interact through an interface involving residues from TM6 and TM7. Silvano et al. [221] showed that the compound SB269,652 is an allosteric antagonist at D_2R and D_3R that potently abolishes specific binding of [^{3}H]nemonapride and [^{3}H]spiperone to D_3Rs while only weakly and partially (20–30%) inhibiting radioligand binding to D_2Rs. Experimental data have shown that the extracellular loop 2 of the D_3R plays a pivotal role in the binding of SB269,652 with high affinity.[221] Furthermore, Shonberg et al. [205] proposed that this compound binds in a dual-steric manner: orthosterically to a protomer of a dimer, antagonizing the action of dopamine, and allosterically modulating the binding of a ligand to the other protomer into the homodimer. Thus, SB269,652 offers new insights into the design of drugs with high selectivity and allosteric properties at the D_2R/D_3R.[210]

3.2. A_{2A}R-D_3R heteromers

Functional interactions of D_3R with other receptor systems are crucial for the modulation of several physiological events. Thus, D_3R can form heteromers with partners within the DAergic family, such as the D_2R-D_3R [207] and the D_1R-D_3R heteromers,[211,212] or with other GPCRs, such as the A_{2A}R-D_3R heteromer [206] (Table 4). In the brain, A_{2A}Rs are found, predominantly, in the striatum,[22] but they are also detected as important pre-synaptic neuromodulators, controlling glutamate release [223] or GABA release.[224] A_{2A}Rs play an important role in neurodegenerative disorders and pharmacological stress. Likewise, it has been proposed that these receptors might be attractive targets for managing psychiatric disorders and for combating drug addiction.[225] Several authors demonstrated that A_{2A}Rs are expressed in the cell surface as homodimers or higher-order oligomers.[226] Based on previous results in ventral striatum [227] and on the high degree of overall sequence homology between D_2Rs and D_3Rs, it has been argued that A_{2A}Rs and D_3Rs may interact directly, in a manner similar to A_{2A}Rs and D_2Rs.[228] In this context, Torvinen et al. [206], using confocal microscopy and FRET analysis, reported the existence of A_{2A}R-D_3R heteromeric complexes in HeLa cells, in which A_{2A}Rs antagonistically modulate both the affinity and the signaling of D_3Rs. These results suggest a new therapeutic possibility of antagonistically modulating D_3Rs, namely through activation of A_{2A}Rs. It has been recognized that antagonism in D_3R may represent a novel and potent antipsychotic mechanism, making the D_3R a good target for the improved drug treatment of schizophrenia. [145,146]

3.3. D_2R-D_3R heteromers

Using coimmunoprecipitation experiments, Scarselli et al. [207] showed that the rat D_2R and D_3R can interact with each other to form a functional heterodimer in COS-7 cultured cells, which exhibits unique functional properties. For example, in cells transfected with the D_3R alone, there is inhibition of AC-V and no detectable decrease in AC-VI was observed. By contrast, cells expressing the D_2R and D_3R inhibit both AC-V and AC-VI. Furthermore, heterologously cotransfected DR fragments [D_2R-trunk(TM1-5)/ D_3R-tail (TM6-7); D_3R-trunk(TM1-5)/ D_2R-tail(TM6-7)] formed functional receptors that bound dopamine D_2R/D_3R agonists and antagonists with pharmacological profiles different to those of native receptors.[207,229] Likewise, in cells cotransfected with the D_2R and D_3R, the antiparkinsonian D_3R-preferring agonists S32504, pramipexole and ropinirole show stronger potency and efficacy at the D_2R-D_3R heteromers versus the individual receptors.[209] The mechanism may involve allosteric receptor–receptor interactions in the D_2R-D_3R heteromer by which the agonist-induced activation of the D_3R can enhance $G\alpha_{i/o}$ coupling of the D_2R to the AC. These observations suggest the relevance of this heteromer in the pathophysiology and treatment of several brain diseases.[230] Furthermore, in cells cotransfected with D_2R and an excess of D_3R, the partial D_2R agonists aripiprazole, S33592, bifeprunox, N-desmethylclozapine, and preclamol lose agonist properties and abolish the actions of quinpirole, suggesting a potential role for the D_2R-D_3R heteromers as a target for antipsychotics and, in particular, for antipsychotics with partial D_2R agonism.[208] The failure to exert partial D_2R agonist activity at the D_2R protomer in this receptor complex may be due to inhibitory allosteric communication from the D_3R protomer, which alters the pharmacological properties of the orthosteric binding pocket of the D_2R protomer through conformational changes. As a consequence, the partial D_2R/D_3R agonist can only bind as a D_2R antagonist. On the other hand, both D_2R and D_3R-preferring agonists induce neurotrophic effects in mesencephalic DAergic neurons,[47] suggesting a role for the D_2R-D_3R heteromer in these effects and in the prevention of pathological alterations that may subsequently lead to neurodegeneration.[225]

The existence of D_2R-D_3R heteromers is of particular interest as the D_2R and D_3R share a high degree of sequence homology and show similar ligand binding profiles.[231] Evidently, the formation of D_2R-D_3R heteromers *in vivo* depends upon the coexpression of these receptors in the same neurons or astrocytes. There is anatomical and functional evidence that D_2Rs and D_3Rs are colocalized in specific populations of cerebral neurons, both postsynaptically to DAergic projections as well as presynaptically on DAergic neurons themselves.[210] Recently, the use of SNAP and CLIP tagging of proteins has proven to be a useful method to

explore protein-protein interactions through time-resolved fluorescence resonance energy transfer. Using this technology, Pou et al. [204] provided the first physical evidence for the existence of human D_2R-D_3R heteromers, and also for the fact that they can coexist at steady state with their corresponding homomers at the cell surface (Table 4).

3.4. D_1R-D_3R heteromers

The striatum receives the densest dopamine innervation and contains the highest density of DRs in the brain.[232] It is widely accepted that D_1R and D_2R subtypes are largely segregated in the two most populated types of striatal neurons, the γ-aminobutyric-acidergic (GABAergic) dynorphinergic neuron, which also expresses substance P (SP; the direct pathway), and the GABAergic enkephalinergic neuron (the indirect pathway), respectively.[233] At least half of the GABAergic SP-dynorphinergic neurons and very few GABAergic enkephalinergic neurons express D_3Rs, which have a very similar pharmacology to the D_2R. Therefore, the D_3Rs could mediate most of the reported interactions between D_1 and D_2-like receptors that have been demonstrated at the striatal neuronal level.[234] In the striatum, D_3Rs are more concentrated in the shell of the NAc and islands of Calleja, where they are also predominantly localized in GABAergic SP-dynorphinergic neurons, and pharmacological studies suggest that D_1R-D_3R interactions could occur at the single-cell level.[235] The evidence for striatal colocalization of D_1R and D_3R provides a framework for the possible existence of direct D_1R-D_3R intermolecular interactions. Because D_1R plays a key role in the motor control by the direct pathway of the basal ganglia, the study of allosteric interactions of D_3R on D_1R into the heteromer may be of high therapeutical interest for treating motor dysfunctions.

The evidence for the physical interaction of these receptor subtypes was obtained from coimmunoprecipitation in rat striatum, and $BRET^2$, stimulation of cAMP formation and cointernalization experiments in HEK 293 cotransfected cells. In these cells, the potency of dopamine in stimulating AC was increased compared with cells expressing only D_1R. This effect of dopamine was prevented either by a D_1R antagonist or a D_3R antagonist, which strongly supports the heteromer formation.[212,230] Simultaneously, Marcellino et al. [211] demonstrated D_1R-D_3R heteromerization by using FRET and BRET techniques in HEK 293 cells co-expressing D_3R-GFP^2 and D1R-YFP or D_3R-Rluc and D1R-YFP, respectively (Figure 2(a) and Table 4). These authors also showed an intramembrane receptor-receptor interaction in calf striatum and transfected cells by radioligand binding experiments. In this D1R-D_3R interaction, D_3R stimulation enhances the binding of D_1R agonist SKF 81297, indicating that D_3R stimulation could potentiate the effects of endogenous dopamine on D1R. Additionally, D_1R stimulation did not modify the binding of the D_3R agonist *R*(+)-7-OH-DPAT, indicating that the intramembrane modulatory interaction may not be reciprocal within the D_1R-D_3R heteromer. Furthermore, clear evidence was found for a selective D_3R-mediated potentiation of D_1R agonist-induced locomotor activation in reserpinized D_3R knockout and wild-type mice, where reserpine depletes endogenous dopamine levels.[211]

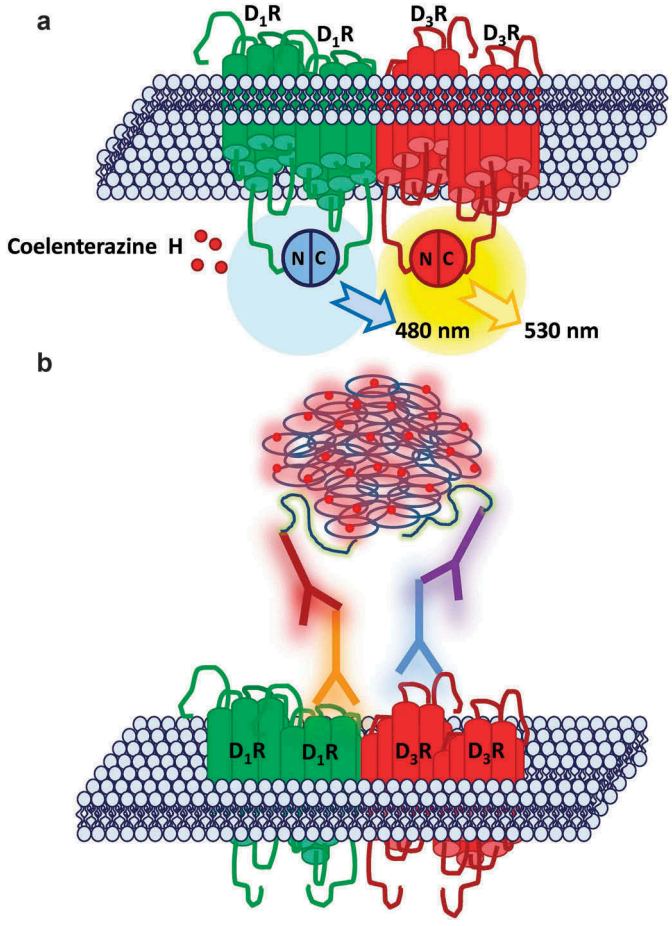


Figure 2. Methods for detection of receptor heteromers. Schematic representation of (a) BRET with BiLC/BiFC and (b) PLA of D_1R–D_3R heteromers. D_1R-D_3R heteromerization was demonstrated by BRET in HEK 293 cells and BiLC of D_1R-nRluc with D_1R-cRluc and BiFC of D_3R-nYFP with D_3R-cYFP. The receptors must be close enough to allow the resonance energy transfer between Rluc and YFP (<10 nm). PLA allows the detection of molecular interactions between two endogenous receptors *ex vivo*, without membrane solubilization. The receptors must be close enough to allow the two antibody-DNA probes to form double-stranded segments (<16 nm), a signal that is further amplified in the presence of fluorescent nucleotides.

More recently, Cruz-Trujillo et al. [213] showed the synergistic interaction between D_1R and D_3R in SN on nerve terminals. In this interaction, D_3R increases dopamine affinity for D1R, increasing cAMP formation and GABA release in striatonigral terminals. This effect is very important as the higher release of GABA seems to mediate LID. By coimmunoprecipitation in rat SNr synaptosomes the authors demonstrated that D1R-D_3R heteromerization was responsible for those effects.[213] In conclusion, as a result of D1R-D_3R heterodimerization, these receptors display functional properties that are remarkably different from those of D_1R and D_3R monomers or homomers. In particular, a unique characteristic of D_1R-D_3R heterodimerization is that it (i) increases the affinity of dopamine for the D_1R and the potency of dopamine in stimulating AC and GABA release in striato-nigral terminals through the D_1R, (ii) abolishes agonist-induced D_1R internalization, and (iii) enables the cytoplasmic sequestration of the receptor complex in response to the paired stimulation of D_1R and D_3R.

Very recently, evidence was obtained for a minimal tetrameric stoichiometry of the heteromer, comprised of D_1R and

D_3R homodimers able to couple to $G\alpha_s$ and $G\alpha_i$ proteins, respectively.[214] This heterotetrameric structure of the D_1R-D_3R heteromer was demonstrated by combining bimolecular fluorescence/luminescence complementation (BiFC/BiLC) with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and CODA-RET assays. For this purpose, the D_1R was fused to the N-terminal or to the C-terminal hemitruncated protein of Rluc (D_1R-nRluc and D_1R-cRluc) that only upon co-expression and complementation can act as a BRET donor. The BRET acceptor protein was obtained upon complementation of the D_3R fused to the N-terminal portion of the YFP Venus protein (D_3R-nYFP) and the D_3R fused to the C-terminal hemitruncated YFP (D_3R-cYFP). When all four receptor constructs were transfected in the cell, a positive and saturable BRET signal was obtained. Using CODA-RET assays, Guitart et al. [214] demonstrated that, upon agonist binding, the D_1R interacts with $G\alpha_s$ and the D_3R interacts with $G\alpha_i$ when forming homomers or heteromers. As it has been argued that two protomers in a GPCR oligomer are insufficient to simultaneously accommodate two trimeric G protein molecules, CODA-RET experiments fit with a model of receptor heteromers comprised of two different homodimers, each able to signal with their preferred G protein.[187,214] Guitart et al. [214], by using selective peptides with the sequence of specific TM domains of the D_1R, found that bimolecular YFP fluorescence complementation was significantly decreased with D_1R TM5 and TM6 peptides, but not with TM7, in the D_1R-D_3R heterotetramer. By using these peptides, the authors also demonstrated ligand-induced allosteric interactions in the D_1R-D_3R heteromer (positive cross talk and cross-antagonism) that constitute specific biochemical characteristics of the D_1R-D_3R heteromer. These allosteric interactions selectively modulated MAPK signaling and were also observed at the level of β-arrestin-1 recruitment, but not at the level of G protein coupling or AC signaling. This study was carried out in HEK cells overexpressing AC-V together with D_1R and D_3R and, unexpectedly, a canonical negative interaction between D_3R and AC, without potentiation of D_1R-mediated effects, was shown.[214] This finding could be reconciled with previous data by considering that cells cotransfected with D_1R and D_3R likely express a heterogeneous population of homomers and heteromers; it is possible that in the presence of high levels of AC-V, D_3R homodimers inhibit cAMP formation, masking the effects mediated by the D_1R-D_3R heteromers.[230]

The above mentionated allosteric modulations may have implications for the treatment of several neuropsychiatric disorders, because the D_1R-D_3R heteromer is being considered as a target for drug development in LID and drug addiction, [187,236,237] both conditions in which there is upregulation of D_3R.[248] Although it is widely accepted that neurons of the dorsal striatum physiologically express low levels of D_3Rs a progressive ectopic expression of D_3Rs has been detected in dorso-striatal MSNs of the direct pathway in hemi-parkinsonian rats chronically treated with L-DOPA.[230,238] D_1R and D_3R play an important role in the development of motor disfunction; the working hypothesis is that dopamine denervation followed by chronic L-DOPA treatment leads to increased D_1R signaling promoted by an upregulation of D_3Rs and by an increase in the expression of D_1R-D_3R heteromers, which produces an imbalance in basal ganglia processing due to increased activation of the direct pathway. [237] Significantly, treatment with D_3R partial agonists (BP 897, ES609) and selective antagonists (S33084, PG01037) was shown to ameliorate LID in animal models of PD, corroborating a role for D_3Rs in the development of motor complications in PD.[247,187,239] Moreover, an increase in D_3R density has been observed in human cocaine fatalities,[240] suggesting that a concomitant increase in D_1R-D_3R heteromers may also occur. The D_1R-D_3R heteromer thus emerges as a target for the treatment of LID and cocaine addiction.[187] As already shown in preclinical models of both conditions, D_3R antagonists should be particularly useful, by blocking both D_3R- and D_1R-mediated β-arrestin-1–dependent MAPK signaling in the striatal D_1R-D_3R heteromer.[214]

The molecular mechanism involved in LID may involve sustained activation of DARPP-32 and ERK1/2 signaling through failure of D_1R protomer internalization.[241,242] This can lead to changes both in the phosphorylation of ion channels and receptors and in the transcription factor-induced formation of adapter proteins in the direct pathway. This may contribute to the formation of pathological long-lived heteroreceptor complexes which can produce abnormal motor programs with errors in the firing patterns and failure of depotentiation when triggered by the overactivated D_1R signaling.[243] Recently, Solís et al. [215] demonstrated that LID was decreased in $D_3R^{-/-}$ mice compared with their WT counterparts. These behavioral responses were accompanied by a reduction in the expression of L-DOPA-induced molecular markers, such as FosB, phospho-ERK, and phosphoacetylation of histone H3. Furthermore, these authors demonstrated that L-DOPA treatment increased D_3R expression in both D_1R direct and D_2R indirect pathway neurons, although the presence of the D_1R-neuron is 2.5- to 3-fold larger. Moreover, pharmacological blockade of D_3Rs diminished LID, without affecting the antiparkinsonian efficacy of L-DOPA.[215]

Finally, DAergic lateralization detected in the striatum at the circuit and cellular levels has both behavioral consequences and therapeutic implications in PD therapy.[216] Radioligand binding assays to rat striatal D_1Rs showed a brain lateralization of the DAergic system that was due to changes in D_1R agonist affinity rather than in receptor expression. D_1R-mediated striatal imbalance resulted from a significantly higher agonist affinity in the left striatum. By means of radioligand binding and proximity ligation assay (PLA), Farré et al. [216] showed an increased expression of both D_3R and D_1R-D_3R heteromers in samples from 6-hydroxy-dopamine-hemilesioned rats that developed dyskinesia following treatment with L-DOPA. By PLA, similar results were also obtained using striatal samples from control and MPTP-lesioned monkeys (Figure 2(b) and Table 4). Radioligand binding studies in the presence of a D_3R agonist led in dyskinetic but not in lesioned or L-DOPA-treated rats to a higher dopamine sensitivity. Upon D_3R activation, the affinity of agonists for binding to the right striatal D_1R increased. Excess dopamine coming from L-DOPA medication likely activates D_3Rs thus making right and left striatal D_1Rs equally responsive to dopamine. These results showed that dyskinesia occurs concurrently with a right/left striatal

balance in D_1R-mediated neurotransmission. Whether balancing due to L-DOPA-induced activation of D_1Rs and D_3Rs is a cause or effect of dyskinesia is a question that requires further investigation.[216–244]

4. Conclusions

It has been reported that the D_3R is a target of high pharmacotherapeutic interest in a variety of neurological and neuropsychiatric disorders including PD, RLS, schizophrenia and drug addiction. A few number of selective D_3R ligands are FDA approved or in clinical trials (see Table 1). This fact highlights that the classical therapeutic outcomes based on monomeric receptors are worse than expected.

DRs can function as oligomers and are capable of forming heteromeric complexes in tissues. To date, four different D_3R oligomers with GPCRs have been reported: the D_3R-D_3R homomer, the A_{2A}R-D_3R heteromer, the D_2R-D_3R heteromer and the D_1R-D_3R heteromer, the latter being the most widely studied. These recent findings on D_3 heteromerization open new perspectives for targeting D_3Rs by heteromer-selective drugs as a novel and more specific therapeutic strategy.

5. Expert opinion

The D_3R has been proposed as a therapeutic target for the development of drugs to treat drug abuse and addiction, as well as a variety of neurological and neurodegenerative disorders such as schizophrenia and PD, respectively. D_3R preferential ligands have been adopted as a strategy for the treatment of these disorders due to the fewer side effects caused. However, the high sequence homology between the D_3R and D_2R has hindered the development of D_3R-selective compounds. Although many D_3R drugs have already been synthesized, continued development of novel D_3R-selective compounds is necessary because there are currently no FDA-approved treatments for psychostimulant addiction, and, to our knowledge, there are no current candidates in phase III clinical trials. Recently, new and promising D_3R-selective antagonists have been developed with higher affinity, selectivity and half-life, and improved oral bioavailability and pharmacodynamic properties, examples being GSK598809, YQA14 and SR21502.

The therapeutic success of D_3R drugs in the near future must involve the identification of new D_3R-preferential ligands with improved physicochemical properties that would provide a more favorable pharmacokinetic/bioavailability profile than is offered by existing D_3R ligands. These selective ligands could then be used as novel therapeutics with maximal clinical efficacy and lowest toxicity. By using D_3R crystal coordinates-based computational models and ligand docking into the active site of D_3R, the design and optimization through the analysis of structure–activity relationships of potent and selective D_3R drugs will be more efficient. Likewise, the discovery of allosteric modulations within GPCRs has generated great interest in the field of drug development due to the possibility of designing novel treatments for a variety of CNS disorders. Allosteric effectors bring an additional dimension to the selectivity for GPCRs, as allosteric sites are not under the same evolutionary pressure as orthosteric sites. Thus, new drugs targeting a D_3R allosteric site would increase drug selectivity and decrease the associate side effects.

Neuropsychiatric disorders are an important social and health care issue. Devising a targeted treatment with nonantipsychotic properties that effectively prevents mania and depression is more challenging, but warrants consideration. Preclinical studies suggest that D_3R versus D_2R-selective compounds might represent an alternative strategy for treating the symptoms of schizophrenia and other neurological disorders. Future research should seek to identify and develop ligands that can bind to more than one site on the same receptor. Thus, the synthesis of new D_3R bitopic ligands displaying both orthosteric and allosteric binding properties could optimize D_3R affinity and D_3R vs. D_2R binding selectivity ratios and might provide functional selectivity. D_3R bitopic ligands could also constitute a promising approach as a relevant therapeutic strategy for PD, and particularly for the treatment of dyskinesias.

Most probably, real cells do not express isolated GPCRs, such as monomeric D_3R, but, rather, receptor heteromers of homomers. Thus, the real drug target is the receptor heteromer/heterotetramer and not the monomer or homomer expressed in heterologous systems. GPCRs are the most important class of membrane proteins in clinical medicine, accounting for >40% of all current marketed drugs. Attempts to discover new drugs have operated under the assumption that GPCRs are monomers and that a specific drug activates a single receptor coupled to a single signal transduction mechanism. Despite the large number of drugs for GPCRs, the therapeutic outcomes based on monomeric receptors are worse than expected. Therefore, this strategy is no longer the most appropriate and the focus should shift to a strategy based on heteromeric GPCRs. A particular advantage of receptor heteromers as targets for drug development is that they can be involved in the pathophysiology of the disorder being targeted. Thus, the receptor heteromer would be more likely to be disease-specific than would the corresponding monomeric/homomeric receptors. Drugs acting on a single receptor within a specific heteromer context are thought to induce a particular downstream signaling. However, there is recent evidence showing that heteromer-selective drugs can be designed and that they can display different affinities for a given receptor depending on the receptor partners contained within the heteromer. The heteromer-selective drug can be a monovalent ligand with higher affinity and selectivity for D_1R-D_3R than for D_3R forming homomeric or other heteromeric complexes. If we want to target both receptors at the same time, we can combine two D_1R-D_3R heteromer-selective drugs or, better, we can use a bivalent ligand of D_1R-D_3R heteromer-selective drugs (see Figure 3). Based on their potency for blocking striatal glutamate release and potency for inducing locomotor activation in rats, two A_{2A}R antagonists, SCH-442416 and KW-6002, have already been found to have preferential pre- or postsynaptic activities, respectively; the better relative affinity of SCH-442416 to A_1R-A_{2A}R heteromer and of KW-6002 to A_{2A}R-D_2R may explain the behavioral actions of these compounds.[195] At present, the number of clearly described heteromer-specific ligands remains small, but it is

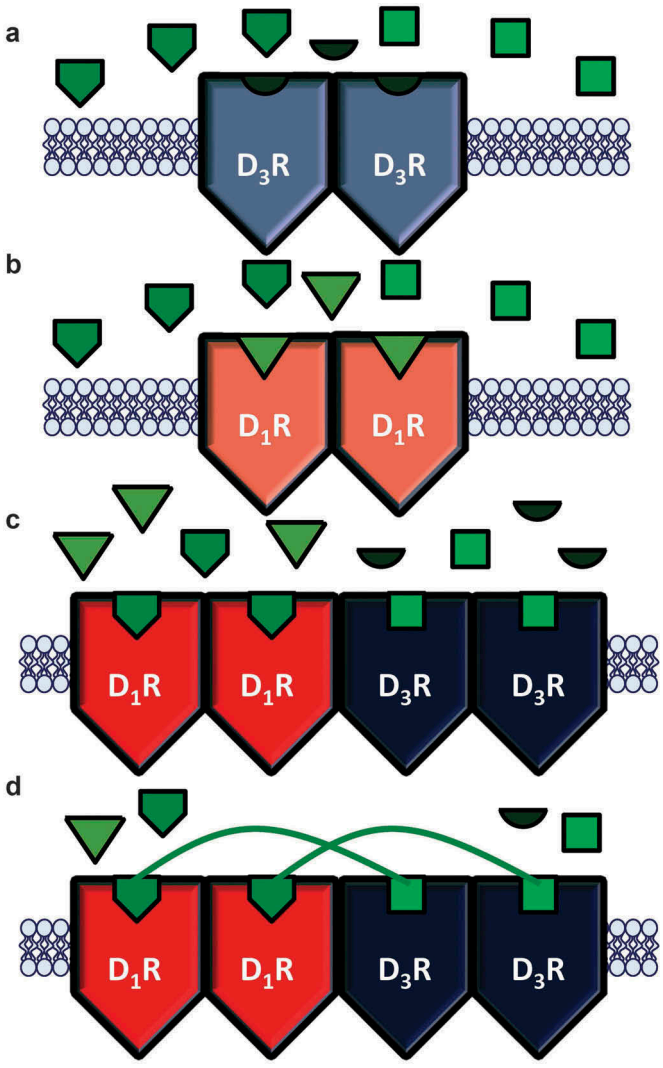


Figure 3. Heteromer-selective drugs. Novel compounds will specifically target and modulate the D_1R–D_3R heteromer versus other heteromers or the corresponding monomeric/homomeric receptors. (a) D_3R-selective or (b) D_1R-selective agonists or antagonists bind to the receptor. (c) One protomer allosterically modulates ligand binding and/or signalling efficacy of the other protomer in the receptor heteromer; as a consequence, new ligand affinities and selectivities appear, e.g. the green square is a D_3R ligand with D_3R-D_1R selectivity. (d) Furthermore, heteromer-selectivity of ligands can be increased by using bivalent ligands.

likely that many heteromer-selective ligands will be discovered in the near future. It therefore seems reasonable to assume that customized drugs targeting a specific receptor heteromer in the CNS might improve safety and efficacy for their therapeutic targets. This approach would undoubtedly result in fewer side effects than classical drugs developed for targeting monomeric GPCRs, with high impact on the clinical utility of these drugs. Receptor heteromers therefore constitute new targets for drug development, with many pharmacological and clinical implications.

Both D_1R and D_3R have been implicated in several disorders including schizophrenia and motor dysfunctions. The discovery of the D_1R-D_3R heteromer in native tissues provides a novel insight into how these receptors may function in an integrated way and constitutes a putative example of a pathology-involved receptor heteromer. It is therefore possible that an increase in the expression of D_1R-D_3R heteromers might be directly involved in LID in patients with PD. This suggests that the D_1R-D_3R complex could represent a potential and promising drug target for disorders related to the DAergic system. The anti-dyskinetic properties of D_3R antagonists or partial agonists may therefore be related to their ability to interrupt the aberrant overstimulation of D_1R signaling (in particular, AC and MAPK) by normalizing the activity of striatal D_1R-D_3R heteromers. These observations point to the possibility of designing novel compounds that specifically target and modulate the D_1R-D_3R heteromer for the prevention or cure of this severe motor dysfunction associated with L-DOPA administration. In this respect, an antagonist that selectively binds to D_3R only when it forms D_1R-D_3R heteromers could have a higher affinity for D_3R on post-synaptic D_1R-MSN than for D_3R on other cell types in the brain where D_3R do not ensamble in D_1R-D_3R heteromers (Figure 3). It might also be potentially useful as an antidyskinetic agent in PD patients. Based on the important role of D_1R-MSN in overactivation of the direct pathway in LID, D_1R agonists and D_3R antagonists (or bivalent ligands with these two moieties that simultaneously bind to two receptors into a dimer) with preferential affinity and/or functional response in D_1R-D_3R heteromers could constitute a promising approach for preferentially targeting these cells with systemically delivered pharmaceuticals. Similarly, the D_2R-D_3R heteromer in DAergic neurons could be a novel therapeutic approach to treat psychostimulant addiction or to prevent pathological alterations that may subsequently lead to DAergic neuron degeneration in PD.

Declaration of interests

This research was supported by grants from the Government of Catalonia [2014-SGR-1236], the Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) [CB06/05/0064] and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad with European Regional Development Funds of the European Union [SAF2014-54840-R]. M Rodríguez-Ruiz is a scholarship from the University of Barcelona. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

References

Papers of special note have been highlighted as
• of interest
•• of considerable interest

1. Rangel-Barajas C, Coronel I, Floran B. Dopamine receptors and neurodegeneration. Aging Dis. 2015;6:349–368. doi:10.14336/AD.2015.0330.
   •• **Complex differences in signaling have been observed in receptors of the D2-like family, especially for the D_3R subtype.**
2. Levite M. Dopamine in the immune system: dopamine receptors in immune cells, potent effects, endogenous production and involvement in immune and neuropsychiatric diseases. In: Levite M, editor. Nerve-driven-immunity-neurotransmitters and neuropeptides in the immune system. Wien: Springer-Verlag; 2012. p. 1–45.
3. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors-IUPHR review 13. Brit J Pharmacol. 2015;172:1–23. doi:10.1111/bph.12906.
   •• **A recent in depth review regarding the signaling, physiology and pharmacology of DRs.**

4. Youdim MBH, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. Nat Rev Neurosci. 2006;7:295–309. doi:10.1038/nrn1883.
5. Meiser J, Weindl D, Hiller K. Complexity of dopamine metabolism. Cell Comm Sign. 2013;11:34. doi:10.1186/1478-811X-11-34.
6. Chaudhry FA, Edwards RH, Fonnum F. Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008;48:277–301. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141146.
7. Zahniser NR, Sorkin A. Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? Neuropharmacology. 2004;47:80–91. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.010.
8. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. Pharmacol Rev. 2011;63:182–217. doi:10.1124/pr.110.002642.
9. Missale C, Nash SR, Robinson SW, et al. Dopamine receptors: from structure to function. Physiol Rev. 1998;78:189–225.
10. Mach RH, Tu Z, Xu J, et al. Endogenous dopamine (DA) competes with the binding of a radiolabeled D_3 receptor partial agonist in vivo: a positron emission tomography study. Synapse. 2011;65(8):724-732. doi:10.1002/syn.20891.
• **Interesting microPET imaging study conducted in monkeys using the dopamine D_3R-selective partial agonist, [^{18}F]LS-3-134. Data indicate that there is a high level of competition between [^{18}F]LS-3-134 and endogenous dopamine for D_3R *in vivo*.**
11. Hurley MJ, Jenner P. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? Pharmacol Therap. 2006;111:715–728. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.12.001.
12. Xu J, Vangveravong S, Li S, et al. Positron emission tomography imaging of dopamine D_2 Receptors using a highly selective radiolabeled D_2Receptor partial agonist. Neuroimage. 2013;71:168–174. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.01.007.
13. Gross G, Drescher K. The role of dopamine D3 receptors in antipsychotic activity and cognitive functions. Handb Exp Pharmacol. 2012;213:167–210. doi:10.1007/978-3-642-25758-2_7.
14. Gurevich EV, Joyce JN. Distribution of dopamine D_3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D_2Receptor expressing neurons. Neuropsychopharmacology. 1999;20:60–80. doi:10.1016/S0893-133X(98)00066-9.
15. Sun J, Xu J, Cairns NJ, et al. Dopamine D1, D2, D3 receptors, vesicular monoamine transporter type-2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) densities in aged human brain. PLoS One. 2012;7(11):e49483.
• **The authors calculate the density of D_1R, D_2R and D_3R using the D_3R-preferring radioligand [^{3}H]WC-10 and the D_2R-preferring radioligand [^{3}H]raclopride using a mathematical model developed by their group.**
16. Sun J, Cairns NJ, Perlmutter JS, et al. Regulation of dopamine D_3 receptor in the striatal regions and substantia nigra in diffuse lewy body disease. Neuroscience. 2013;248:112–126. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.05.048
17. Prante O, Maschauer S, Banerjee A. Radioligands for the dopamine receptor subtypes. J Labelled Comp Radiopharm. 2013;56(3–4):130–148. doi:10.1002/jlcr.3000.
18. Wilson AA, McCormick P, Kapur S, et al. Radiosynthesis and evaluation of [^{11} C]-(+)4-propyl-3,4,4a,5,6,10b-hexahydro-2H-naphtho[1,2-b][1,4]oxazin-9-ol as a potential radiotracer for in vivo imaging of the dopamine D_2 high-affinity state with positron emission tomography. J Med Chem. 2005;48:4153–4160. doi:10.1021/jm050155n.
19. Freedman SB, Patel S, Marwood R, et al. Expression and pharmacological characterization of the human D_3 dopamine receptor. J Pharmacol Exp Ther. 1994;268:417–426.
20. Gallezot JD, Beaver JD, Gunn RN, et al. Affinity and selectivity of [^{11}C]-(+)-PHNO for the D3 and D_2Receptors in the rhesus monkey brain in vivo. Synapse. 2012;66:489–500. doi:10.1002/syn.21535.
21. Le Foll B, Wilson AA, Graff A, et al. Recent methods for measuring dopamine D3 receptor occupancy in vivo: importance for drug development. Front Pharmacol. 2014;5:161. doi:10.3389/fphar.2014.00161.
• **The review shows the utility of [^{11}C]-(+)-PHNO binding in preclinical and clinical approaches for the measurement of occupancy of both D_3R and D_2R.**
22. Searle G, Beaver JD, Comley RA, et al. Imaging dopamine D3 receptors in the human brain with positron emission tomography, [11C]PHNO, and a selective D3 receptor antagonist. Biol Psychiatry. 2010;68:392–399. doi:10.1016/j.biopsych.2010.04.038.
•• **First quantification of D_3R availabilities with PET in living human brain.**
23. Tziortzi AC, Searle GE, Tzimopoulou S, et al. Imaging dopamine receptors in humans with [^{11}C]-(+)-PHNO: dissection of D_3 signal and anatomy. Neuroimage. 2011;54:264–277. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.044.
24. Boeckler F, Gmeiner P. Dopamine D3 receptor ligands: recent advances in the control of subtype selectivity and intrinsic activity. Biochim Biophys Acta. 2007;1768:871–887. doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.001.
25. Keck TM, Burzynski C, Shi L, et al. Beyond small-molecule SAR: using the dopamine D3 receptor crystal structure to guide drug design. Adv Pharmacol. 2014;69:267–300. doi:10.1016/B978-0-12-420118-7.00007-X.
• **The review describes new structure-based rational drug design strategies for D3R-selective ligands.**
26. Kassel S, Schwed JS, Stark H. Dopamine D3 receptor agonists as pharmacological tools. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25:1480–1499. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.11.005.
• **Interesting review that describe the two major classes of D_3R agonists.**
27. Pich EM, Collo G. Pharmacological targeting of dopamine D3 receptors: possible clinical applications of selective drugs. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25:1437–1447. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.07.012.
28. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, et al. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. Nature. 1990;347:146–151. doi:10.1038/347146a0.
•• **Cloning, localization and first pharmacological characterization of de D_3R.**
29. MacKenzie RG, VanLeeuwen D, Pugsley TA, et al. Characterization of the human dopamine D3 receptor expressed in transfected cell lines. Eur J Pharmacol. 1994;266:79–85.
30. Robinson SW, Caron MG. Selective inhibition of adenylyl cyclase type V by the dopamine D3 receptor. Mol Pharmacol. 1997;52:508–514.
31. Jin M, Min C, Zheng M, et al. Multiple signaling routes involved in the regulation of adenylyl cyclase and extracellular regulated kinase by dopamine D_2 and D3 receptors. Pharmacol Res. 2013;67:31–41. doi:10.1016/j.phrs.2012.09.012.
32. Collo G, Bono F, Cavalleri L, et al. Pre-synaptic dopamine D3 receptor mediates cocaine-induced structural plasticity in mesencephalic dopaminergic neurons via ERK and Akt pathways. J Neurochem. 2012;120:765–778. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07618.x.
33. Chien EY, Liu W, Zhao Q, et al. Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D_2/D_3 selective antagonist. Science. 2010;330:1091–1095. doi:10.1126/science.1197410.
•• **Crystal structure of D_3R that has helped to the more rational design of D_3R selective ligands.**
34. Blagg J, Allerton CM, Batchelor DV, et al. Design and synthesis of a functionally selective D_3 agonist and its in vivo delivery via the intranasal route. Bioorg Med Chem Lett. 2007;17(24):6691–6696. doi:10.1016/j.bmcl.2007.10.059.
35. Newman AH, Beuming T, Banala AK, et al. Molecular determinants of selectivity and efficacy at the dopamine D3 receptor. J Med Chem. 2012;55:6689–6699. doi:10.1021/jm300482h.
•• **The study identifies critical components for the binding specificity and the efficacy of D_3R targeted compounds combining different techniques.**
36. Michino M, Donthamsetti P, Beuming T, et al. A single glycine in extracellular loop 1 is the critical determinant for pharmacological specificity of dopamine D_2 and D3 receptors. Mol Pharmacol. 2013;84:854–864. doi:10.1124/mol.113.087833.

37. Wang Q, Mach RH, Luedtke RR, et al. Subtype selectivity of dopamine receptor ligands: insights from structure and ligand-based methods. J Chem Inf Model. 2010;50(11):1970–1985. doi:10.1021/ci1002747.
38. Biswas S, Zhang S, Fernandez F, et al. Further structure-activity relationships study of hybrid 7-([2-(4-Phenylpiperazin-1-yl)ethyl] propylamino)-5,6,7,8-tetrahydronaphtalen-2-ol analogues: identification of a high-affinity D_3-preferring agonist with potent in vivo activity with long duration of action. J Med Chem. 2008;51:101–117. doi:10.1021/jm070860r.
39. Newman AH, Blaylock BL, Nader MA, et al. Medication discovery for addiction: translating the dopamine D3 receptor hypothesis. Biochem Pharmacol. 2012;84:882–890. doi:10.1016/j.bcp.2012.06.023.
40. Wilt TJ, MacDonald R, Ouellette J, et al. Pharmacologic therapy for primary restless legs syndrome: a systematic review and meta-analysis. JAMA Intern Med. 2013;173:496–505. doi:10.1001/jamainternmed.2013.3733.
41. Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, et al. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016.Epub 2015 Mar 20. doi:10.1136/jnnp-2014-309676.
42. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease. A review. JAMA. 2014;311:1670–1683. doi:10.1001/jama.2014.3654.
43. LeWitt PA. Levodopa therapy for Parkinson's disease: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Mov Disorders. 2015;30:64–72. doi:10.1002/mds.26082.
44. Wijeyekoon R, Barker RA. Cell replacement therapy for Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta. 2009;1792:688–702. doi:10.1016/j.bbadis.2008.10.007.
45. Blandini F, Armentero M-T. Dopamine receptor agonists for Parkinson's disease. Expert Opin Investig Drugs. 2014;23:387–410. doi:10.1517/13543784.2014.869209.

•• **A recent review about dopamine agonist drugs as one of the main ways to treat Parkinson's symptoms.**

46. Joyce JN, Millan MJ. Dopamine D3 receptor agonists for protection and repair in Parkinson's disease. Curr Opin Pharmacol. 2007;7:100–105. doi:10.1016/j.coph.2006.11.004.
47. Collo G, Zanetti S, Missale C, et al. Dopamine D3 receptor-preferring agonists increase dendrite arborization of mesencephalic dopaminergic neurons via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. Eur J Neurosci. 2008;28:1231–1240. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06423.x.
48. Wong A, Eloy JA, Couldwell WT, et al. Update on prolactinomas. Part 1: clinical manifestations and diagnostic challenges. J Clin Neurosci. 2015;22:1562–1567. doi:10.1016/j.jocn.2015.03.058.
49. Millan MJ, Maiofiss L, Cussac D, et al. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. J Pharmacol Exp Therapeut. 2002;303:791–804. doi:10.1124/jpet.102.039867.
50. Antonini A, Barone P, Ceravolo R, et al. Role of pramipexole in the management of Parkinson's disease. CNS Drugs. 2010;24:829–841. doi:10.2165/11585090-000000000-00000.
51. Schapira AH, Barone P, Hauser RA, et al. Extended-release pramipexole in advanced Parkinson disease: a randomized controlled trial. Neurology. 2011;77:767–774. doi:10.1212/WNL.0b013e31822affdb.
52. Frampton JE. Pramipexole extended-release: a review of its use in patients with Parkinson's disease. Drugs. 2014;74:2175–2190. doi:10.1007/s40265-014-0322-5.
53. Stocchi F, Radicati FG, Torti M. Drug safety evaluation of ropinirole prolonged release. Expert Opin Drug Saf. 2014;13:383–389. doi:10.1517/14740338.2014.870152.
54. Carnicella S, Drui G, Boulet S, et al. Implication of dopamine D3 receptor activation in the reversion of Parkinson's disease-related motivational deficits. Transl Psychiatry. 2014;4:e401.

• **The authors provide strong evidence for the role of D_3R in motivational processes and identify this receptor as a potential target for the treatment of PD.**

55. Riddle LR, Kumar R, Griffin SA, et al. Evaluation of the D_3 dopamine receptor selective agonist /partial agonist PG 01042 on L-Dopa dependent animal involuntary movements in rats. Neuropharmacology. 2011;60(2–3):284–294. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.09.011.
56. Tatsioni A, Reichmann H, Konitsiotis S. Dopamine agonist monotherapy in Parkinson's disease and potential risk factors for dyskinesia: a meta-analysis of levodopa-controlled trials. Eur J Neurol. 2014;21:433–440. doi:10.1111/ene.12318.
57. Searle GE, Beaver JD, Tziortzi A, et al. Mathematical modelling of [^{11}C]-(+)-PHNO human competition studies. Neuroimage. 2013;68:119–132. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.11.033.
58. Matuskey D, Gallezot JD, Pittman B, et al. Dopamine D3 receptor alterations in cocaine-dependent humans imaged with [^{11}C]-(+)-PHNO. Drug Alcohol Depend. 2014;139:100–105. doi:10.1016/j.drugalcdep.2014.03.013.
59. Trenkwalder C, Winkelmann J, Inoue Y, et al. Restless legs syndrome-current therapies and management of augmentation. Nat Rev Neurol. 2015;11:434–445. doi:10.1038/nrneurol.2015.122.
60. Wood M, Dubois V, Scheller D, et al. Rotigotine is a potent agonist at dopamine D1Receptors as well as at dopamine D_2 and D3 receptors. Br J Pharmacol. 2015;172(4):1124–1135. doi:10.1111/bph.12988.
61. Scheller D, Ullmer C, Berkels R, et al. The in vitro receptor profile of rotigotine: a new agent for the treatment of Parkinson's disease. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009;379(1):73–86. doi:10.1007/s00210-008-0341-4.
62. Sachs GS, Greenberg WM, Starace A, et al. Cariprazine in the treatment of acute mania in bipolar I disorder: a double-blind, placebo-controlled, phase III trial. J Affect Disord. 2015;174:296–302. doi:10.1016/j.jad.2014.11.018.
63. Kiss B, Horvath A, Nemethy Z, et al. Cariprazine (RGH-188), a dopamine D3 receptor preferring, D_3/D_2 dopamine receptor antagonist-partial agonist antipsychotic candidate: in vitro and neurochemical profile. J Pharmacol Exp Therap. 2010;333:328–340. doi:10.1124/jpet.109.160432.
64. Kane JM, Zukin S, Wang Y, et al. Efficacy and safety of cariprazine in acute exacerbation of schizophrenia. J Clin Psychopharmacol. 2015;35:367–373. doi:10.1097/JCP.0000000000000346.
65. Citrome L. Cariprazine: chemistry, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and metabolism, clinical efficacy, safety, and tolerability. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013;9:193–206. doi:10.1517/17425255.2013.759211.
66. Redden L, Rendenbach-Mueller B, Abi-Saab WM, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled study of the dopamine D_3 receptor antagonist ABT-925 in patients with acute schizophrenia. J Clin Psychopharmacol. 2011;31:221–225. doi:10.1097/JCP.0b013e31820e4818.
67. Bhathena A, Wang Y, Kraft JB, et al. Association of dopamine-related genetic loci to dopamine D3 receptor antagonist ABT-925 clinical response. Transl Psychiatry. 2013;3:e245. doi:10.1038/tp.2013.22.
68. Mugnaini M, Iavarone L, Cavallini P, et al. Occupancy of brain dopamine D3 receptors and drug craving: a translational approach. Neuropsychopharmacology. 2013;38:302–312. doi:10.1038/npp.2012.171.

• **By autoradiography and PET, the authors demonstrate for the first time the ability of the selective antagonist GSK598809 to reduce nicotine-seeking in rats.**

69. Micheli F, Arista L, Bonanomi G, et al. 1,2,4-triazolyl azabicyclo[3.1.0] hexanes: a new series of potent and selective dopamine D($_3$) receptor antagonists. J Med Chem. 2010;53:374–391. doi:10.1021/jm901319p.
70. Erritzoe D, Tziortzi A, Bargiela D, et al. In vivo imaging of cerebral dopamine D3 receptors in alcoholism. Neuropsychopharmacology. 2014;39:1703–1712. doi:10.1038/npp.2014.18.
71. Xi ZX, Spiller K, Gardner EL. Mechanism-based medication development for the treatment of nicotine dependence. Acta Pharmacol Sin. 2009;30:723–739. doi:10.1038/aps.2009.46.
72. Sánchez-Soto M, Bonifazi A, Cai NS, et al. Evidence for noncanonical neurotransmitter activation: norepinephrine as a dopamine D_2-like receptor agonist. Mol Pharmacol. 2016;89(4):457–466. doi:10.1124/mol.115.101808.

73. Gerlach M, Double K, Arzberger T, et al. Dopamine receptor agonists in current clinical use: comparative dopamine receptor binding profiles defined in the human striatum. J Neural Transm (Vienna). 2003;110(10):1119–1127. doi:10.1007/s00702-003-0027-5.
74. Coldwell MC, Boyfield I, Brown AM, et al. Pharmacological characterization of extracellular acidification rate responses in human D_2(long), D_3 and $D_{4.4}$ receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Br J Pharmacol. 1999;127(5):1135–1144. doi:10.1038/sj.bjp.0702657.
75. Scheideler MA, Martin J, Hohlweg R, et al. The preferential dopamine D3 receptor agonist cis-8-OH-PBZI induces limbic Fos expression in rat brain. Eur J Pharmacol. 1997;339(2–3):261–270.
76. Millan MJ, Girardon S, Monneyron S, et al. Discriminative stimulus properties of the dopamine D3 receptor agonists, PD128,907 and 7-OH-DPAT: a comparative characterization with novel ligands at D_3 versus D_2Receptors. Neuropharmacology. 2000;39(4):586–598.
77. Vanhauwe JF, Fraeyman N, Francken BJ, et al. Comparison of the ligand binding and signaling properties of human dopamine $D_{(2)}$ and $D_{(3)}$ receptors in Chinese hamster ovary cells. J Pharmacol Exp Ther. 1999;290(2):908–916.
78. van Vliet LA, Tepper PG, Dijkstra D, et al. Affinity for dopamine D_2, D_3, and D_4 receptors of 2-aminotetralins. Relevance of D_2 agonist binding for determination of receptor subtype selectivity. J Med Chem. 1996;39(21):4233–4237. doi:10.1021/jm960345l.
79. Patel J, Trout SJ, Palij P, et al. Biphasic inhibition of stimulated endogenous dopamine release by 7-OH-DPAT in slices of rat nucleus accumbens. Br J Pharmacol. 1995;115(3):421–426.
80. Luedtke RR, Mishra Y, Wang Q, et al. Comparison of the binding and functional properties of two structurally different D_2 dopamine receptor subtype selective compounds. ACS Chem Neurosci. 2012;3(12):1050–1062. doi:10.1021/cn300142q.
81. Elsner J, Boeckler F, Heinemann FW, et al. Pharmacophore-guided drug discovery investigations leading to bioactive 5-aminotetrahydropyrazolopyridines. Implications for the binding mode of heterocyclic dopamine D3 receptor agonists. J Med Chem. 2005;48(18):5771–5779. doi:10.1021/jm0503805.
82. Peglion JL, Poitevin C, Mannoury La Cour C, et al. Modulations of the amide function of the preferential dopamine D_3 agonist (R,R)-S32504: improvements of affinity and selectivity for D_3 versus D_2Receptors. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19(8):2133–2138. doi:10.1016/j.bmcl.2009.03.015.
83. Burris KD, Filtz TM, Chumpradit S, et al. Characterization of [125I](R)-trans-7-hydroxy-2-[N-propyl-N-(3′-iodo-2′-propenyl)amino] tetralin binding to dopamine D3 receptors in rat olfactory tubercle. J Pharmacol Exp Ther. 1994;268(2):935–942.
84. Ghosh B, Antonio T, Reith ME, et al. Discovery of 4-(4-(2-((5-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2 yl)(propyl)amino)ethyl) piperazin-1-yl)quinolin-8-ol and its analogues as highly potent dopamine D_2/D_3 agonists and as iron chelator: in vivo activity indicates potential application in symptomatic and neuroprotective therapy for Parkinson's disease. J Med Chem. 2010;53(5):2114–2125. doi:10.1021/jm901618d.
85. Lenz C, Haubmann C, Hübner H, et al. Fancy bioisosteres: synthesis and dopaminergic properties of the endiyne FAUC 88 as a novel non-aromatic D3 agonist. Bioorg Med Chem. 2005;13(1):185–191. doi:10.1016/j.bmc.2004.09.044.
86. Collins GT, Butler P, Wayman C, et al. Lack of abuse potential in a highly selective dopamine D3 agonist, PF-592,379, in drug self-administration and drug discrimination in rats. Behav Pharmacol. 2012;23(3):280–291. doi:10.1097/FBP.0b013e3283536d21.
87. Grundt P, Prevatt KM, Cao J, et al. Heterocyclic analogues of N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)arylcarboxamides with functionalized linking chains as novel dopamine D3 receptor ligands: potential substance abuse therapeutic agents. J Med Chem. 2007;50(17):4135–4146. doi:10.1021/jm0704200.
88. Johnson M, Antonio T, Reith ME, et al. Structure-activity relationship study of N^6-(2-(4-(1H-Indol-5-yl)piperazin-1-yl)ethyl)-N^6-propyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[d]thiazole-2,6-diamine analogues: development of highly selective D_3 dopamine receptor agonists along with a highly potent D_2/D_3 agonist and their pharmacological characterization. J Med Chem. 2012;55(12):5826–5840. doi:10.1021/jm300268s.
89. Leopoldo M, Lacivita E, Colabufo NA, et al. Synthesis and binding profile of constrained analogues of N-[4-(4-arylpiperazin-1-yl) butyl]-3-methoxybenzamides, a class of potent dopamine D3 receptor ligands. J Pharm Pharmacol. 2006;58(2):209–218. doi:10.1211/jpp.58.2.0008.
90. Chen J, Levant B, Wang S. High-affinity and selective dopamine D_3 receptor full agonists. Bioorg Med Chem Lett. 2012;22(17):5612–5617. doi:10.1016/j.bmcl.2012.07.003.
91. Chen J, Collins GT, Levant B, et al. A potent and highly selective dopamine D3 receptor full agonist. ACS Med Chem Lett. 2011;2(8):620–625. doi:10.1021/ml200100t.
92. Chen J, Jiang C, Levant B, et al. Pramipexole derivatives as potent and selective dopamine $D_{(3)}$ receptor agonists with improved human microsomal stability. ChemMedChem. 2014;9(12):2653–2660. doi:10.1002/cmdc.201402398.
93. Chu W, Tu Z, McElveen E, et al. Synthesis and in vitro binding of N-phenyl piperazine analogs as potential dopamine D3 receptor ligands. Bioorg Med Chem. 2005;13(1):77–87.
94. Xu J, Chu W, Tu Z, et al. [(3)H]4-(Dimethylamino)-N-[4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin- 1-yl)butyl]benzamide, a selective radioligand for dopamine $D_{(3)}$ receptors. I. in Vitro Characterization. Synapse. 2009;63(9):717–728.
95. Cheung TH, Loriaux AL, Weber SM, et al. Reduction of cocaine self-administration and D3 receptor-mediated behavior by two novel dopamine D3 receptor-selective partial agonists, OS-3-106 and WW-III-55. J Pharmacol Exp Ther. 2013;347(2):410–423. doi:10.1124/jpet.112.202911.
    - **The study identifies novel highly selective partial agonists at the D_3R that may be useful in reducing the motivation to seek cocaine.**
96. Bettinetti L, Schlotter K, Hübner H, et al. Interactive SAR studies: rational discovery of super-potent and highly selective dopamine D3 receptor antagonists and partial agonists. J Med Chem. 2002;45(21):4594–4597.
97. Chen J, Collins GT, Zhang J, et al. Design, synthesis, and evaluation of potent and selective ligands for the dopamine 3 (D_3) receptor with a novel in vivo behavioral profile. J Med Chem. 2008;51(19):5905–5908. doi:10.1021/jm800471h.
98. Dörfler M, Tschammer N, Hamperl K, et al. Novel D_3 selective dopaminergics incorporating enyne units as nonaromatic catechol bioisosteres: synthesis, bioactivity, and mutagenesis studies. J Med Chem. 2008;51(21):6829–6838. doi:10.1021/jm800895v.
99. Allen RP, Picchietti DL, Garcia-Borreguero D, et al. Restless legs syndrome/Willis-Ekbom disease diagnostic criteria: updated international restless legs syndrome study group (IRLSSG) consensus criteria-history, rationale, description, and significance. Sleep Med. 2014;15:860–873. doi:10.1016/j.sleep.2014.03.025.
100. Moore TJ, Glenmullen J, Mattison DR. Reports of pathological gambling, hypersexuality, and compulsive shopping associated with dopamine receptor agonist drugs. JAM Intern Med. 2014;174:1930–1933. doi:10.1001/jamainternmed.2014.5262.
101. Weintraub D, Nirenberg MJ. Impulse control and related disorders in Parkinson's disease. Neurodegener Dis. 2013;11:63–71. doi:10.1159/000341996.
102. Smith KM, Xie SX, Weintraub D. Incident impulse control disorder symptoms and dopamine transporter imaging in Parkinson's disease. Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016. Epub 2015 Nov 3. doi:10.1136/jnnp-2015-311827.
103. Lieberman JA. Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotics. CNS Drugs. 2004;18:251–267.
104. Czoty PW, Gage HD, Garg PK, et al. Effects of repeated treatment with the dopamine D2/D3 receptor partial agonist aripiprazole on striatal D_2/D3 receptor availability in monkeys. Psychopharmacology. 2014;231:613–619. doi:10.1007/s00213-013-3274-7.
105. Boeckler F, Gmeiner P. The structural evolution of dopamine D3 receptor ligands: structure-activity relationships and selected

neuropharmacological aspects. Pharmacol Ther. 2006;112:281–333. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.04.007.
106. Heidbreder CA, Newman MH. Current perspectives on selective dopamine D3 receptor antagonist as pharmacotherapeutics for addictions and related disorders. Ann NY Acad Sci. 2010;1187:4–34. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05149.x.
107. Micheli F, Heidbreder C. Dopamine D3 receptor antagonists: a patent review (2007-2012). Expert Opin Ther Pat. 2013;23:363–381. doi:10.1517/13543776.2013.757593.
•• **Recent patent review of different antagonists in 2007-2012.**
108. Micheli F. Recent advances in the development of dopamine D3 receptor antagonists: a medicinal chemistry perspective. ChemMedChem. 2011;6:1152–1162. doi:10.1002/cmdc.201000538.
109. Hidaka K, Tada S, Matsumoto M, et al. In vitro pharmacological profile of YM-43611, a novel D_2-like receptor antagonist with high affinity and selectivity for dopamine D_3 and D_4 receptors. Br J Pharmacol. 1996;117(8):1625–1632.
110. Tang L, Todd RD, Heller A, et al. Pharmacological and functional characterization of D_2, D_3 and D_4 dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. J Pharmacol Exp Ther. 1994;268(1):495–502.
111. Köhler C, Hall H, Ogren SO, et al. Specific in vitro and in vivo binding of ^{3}H-raclopride. A potent substituted benzamide drug with high affinity for dopamine D_2Receptors in the rat brain. Biochem Pharmacol. 1985;34(13):2251–2259.
112. Malmberg A, Jackson DM, Eriksson A, et al. Unique binding characteristics of antipsychotic agents interacting with human dopamine D_{2A}, D_{2B}, and D3 receptors. Mol Pharmacol. 1993;43(5):749–754.
113. Millan MJ, Audinot V, Melon C, et al. Evidence that dopamine D3 receptors participate in clozapine-induced hypothermia. Eur J Pharmacol. 1995;280(2):225–229.
114. Tadori Y, Forbes RA, McQuade RD, et al. Functional potencies of dopamine agonists and antagonists at human dopamine D_2 and D_3 receptors. Eur J Pharmacol. 2011;666(1–3):43–52. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.050.
115. Schoemaker H, Claustre Y, Fage D, et al. Neurochemical characteristics of amisulpride, an atypical dopamine D_2/D3 receptor antagonist with both presynaptic and limbic selectivity. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280(1):83–97.
116. Rangel-Barajas C, Malik M, Vangveravong S, et al. Pharmacological modulation of abnormal involuntary DOI-induced head twitch response in male DBA/2J mice: I. Effects of D_2/D_3 and D_2 dopamine receptor selective compounds. Neuropharmacology. 2014;83:18–27. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.03.003.
117. Nader MA, Green KL, Luedtke RR, et al. The effects of benzamide analogues on cocaine self-administration in rhesus monkeys. Psychopharmacology (Berl). 1999;147(2):143–152.
118. Audinot V, Newman-Tancredi A, Gobert A, et al. A comparative in vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel dopamine D3 receptor antagonists (+)-S 14297, nafadotride, GR 103,691 and U 99194. J Pharmacol Exp Ther. 1998;287(1):187–197.
119. Sonesson C, Lin CH, Hansson L, et al. Substituted (S)-phenylpiperidines and rigid congeners as preferential dopamine autoreceptor antagonists: synthesis and structure-activity relationships. J Med Chem. 1994;37(17):2735–2753.
120. Sautel F, Griffon N, Sokoloff P, et al. Nafadotride, a potent preferential dopamine D3 receptor antagonist, activates locomotion in rodents. J Pharmacol Exp Ther. 1995;275(3):1239–1246.
121. Millan MJ, Mannoury la Cour C, Novi F, et al. S33138 [N-[4-[2-[(3aS,9bR)-8-cyano-1,3a,4,9b-tetrahydro[1]-benzopyrano[3,4-c]pyrrol-2(3H)-yl)-ethyl]phenylacetamide], a preferential dopamine D_3 versus D_2Receptor antagonist and potential antipsychotic agent: I. Receptor-binding profile and functional actions at G-protein-coupled receptors. J Pharmacol Exp Ther. 2008;324(2):587–599. doi:10.1124/jpet.107.126706.
122. Park WK, Jeong D, Yun CW, et al. Pharmacological actions of a novel and selective dopamine D3 receptor antagonist, KCH-1110. Pharmacol Res. 2003;48(6):615–622.
123. Kumar V, Banala AK, Garcia EG, et al. Chiral resolution and serendipitous fluorination reaction for the selective dopamine D3 receptor antagonist BAK2-66. ACS Med Chem Lett. 2014;5(6):647–651. doi:10.1021/ml500006v.
124. Reavill C, Taylor SG, Wood MD, et al. Pharmacological actions of a novel, high-affinity, and selective human dopamine $D_{(3)}$ receptor antagonist, SB-277011-A. J Pharmacol Exp Ther. 2000;294(3):1154–1165.
125. Kiss B, Laszlovszky I, Horváth A, et al. Subnanomolar dopamine D3 receptor antagonism coupled to moderate D_2 affinity results in favourable antipsychotic-like activity in rodent models: I. neurochemical characterisation of RG-15. Arch Pharmacol. 2008;378(5):515–528. doi:10.1007/s00210-008-0308-5.
126. Boateng CA, Bakare OM, Zhan J, et al. High affinity dopamine D3 receptor (D_3R)-selective antagonists attenuate heroin self-administration in wild-type but not D_3R knockout mice. J Med Chem. 2015;58:6195–6213. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00776.
127. Dubuffet T, Newman-Tancredi A, Cussac D, et al. Novel benzopyrano[3,4-c]pyrrole derivatives as potent and selective dopamine D3 receptor antagonist. Bioorg Med Chem Lett. 1999;9(14):2059–2064.
128. Geneste H, Amberg W, Backfisch G, et al. Synthesis and SAR of highly potent and selective dopamine D_3-receptor antagonists: variations on the 1H-pyrimidin-2-one theme. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16(7):1934–1937. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.079.
129. Galaj E, Ananthan S, Saliba M, et al. The effects of the novel DA D3 receptor antagonist SR 21502 on cocaine reward, cocaine seeking and cocaine-induced locomotor activity in rats. Psychopharmacology. 2014;231:501–510. doi:10.1007/s00213-013-3254-y.
• **The authors report a novel selective D_3R antagonist that decreases cocaine reward, cocaine-seeking and locomotor activity.**
130. Sun X, Gou H-Y, Li F, et al. Y-QA31, a novel dopamine D3 receptor antagonist, exhibits antipsychotic-like properties in preclinical animal models of schizophrenia. Acta Pharmacol Sin. 2016;37(3):322–333. doi:10.1038/aps.2015.105.
131. Song R, Yang RF, Wu N, et al. YQA 14: a novel dopamine D3 receptor antagonist that inhibits cocaine self-administration in rats and mice, but not in D_3R-knockout mice. Addict Biol. 2012;17:259–273. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00317.x.
132. Keck TM, John WS, Czoty PW, et al. Identifying medication targets for psychostimulant addiction: unravelling the dopamine D3 receptor hypothesis. J Med Chem. 2015;58:5361–5380. doi:10.1021/jm501512b.
133. Newman AH, Grundt P, Cyriac G, et al. N-(4-(4-(2,3-dichloro- or 2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)heterobiarylcarboxamides with functionalized linking chains as high affinity and enantioselective D3 receptor antagonists. J Med Chem. 2009;52:2559–2570. doi:10.1021/jm900095y.
• **Identification of the first enantioselective D_3R antagonist and synthesis of same compounds with high D_3R affinity and 400-fold selectivity over D_2R.**
134. Chen J, Levant B, Jiang C, et al. Tranylcypromine substituted cis-hydroxycyclobutylnaphthamides as potent and selective dopamine D_3 receptor antagonists. J Med Chem. 2014;57(11):4962–4968. doi:10.1021/jm401798r.
135. Newman AH, Grundt P, Nader MA. Dopamine D3 receptor partial agonists and antagonists as potential drug abuse therapeutic agents. J Med Chem. 2005;48:3663–3679. doi:10.1021/jm040190e.
136. Robarge MJ, Husbands SM, Kieltyka A, et al. Design and synthesis of [(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]alkylfluorenylcarboxamides as novel ligands selective for the dopamine D3 receptor subtype. J Med Chem. 2001;44(19):3175–3186.
137. Yuan J, Chen X, Brodbeck R, et al. NGB 2904 and NGB 2849: two highly selective dopamine D3 receptor antagonists. Bioorg Med Chem Lett. 1998;8(19):2715–2718.
138. Zhang M, Ballard ME, Kohlhaas KL, et al. Effect of dopamine D_3 antagonists on PPI in DBA/2J mice or PPI deficit induced by neonatal

ventral hippocampal lesions in rats. Neuropsychopharmacology. 2006;31(7):1382–1392. doi:10.1038/sj.npp.1300985.
139. Carlsson J, Coleman RG, Setola V, et al. Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. Nat Chem Biol. 2011;7:769–778. doi:10.1038/nchembio.662.
140. Ananthan S, Saini SK, Zhou G, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of a series of [4-(4-carboxamidobutyl)]-1-arylpiperazines: insights into structural features contributing to dopamine D_3 versus D_2Receptor subtype selectivity. J Med Chem. 2014;57:7042–7060. doi:10.1021/jm500801r.
141. Banala AK, Levy BA, Khatri SS, et al. N-(3-fluoro-4-(4-(2-methoxy or 2,3-dichlorophenyl)piperazine-1-yl)butyl)arylcarboxamides as selective dopamine D3 receptor ligands: critical role of the carboxamide linker for D3 receptor selectivity. J Med Chem. 2011;54:3581–3594. doi:10.1021/jm200288r.
142. Taylor M, Grundt P, Griffin SA, et al. Dopamine D3 receptor selective ligands with varying intrinsic efficacies at adenylyl cyclase inhibition and mitogenic signaling pathways. Synapse. 2010;64:251–266. doi:10.1002/syn.20725.
143. Song R, Bi G-H, Zhang H-Y, et al. Blockade of D3 receptors by YQA14 inhibits cocaine's rewarding effects and relapse to drug-seeking behavior in rats. Neuropharmacology. 2014;77:398–405. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.010.
• **Description of novel D_3R antagonists with improved half-life and pharmacokinetic profile and potent pharmacotherapeutic efficacy in attenuating cocaine reward.**
144. Furman CA, Roof RA, Moritz AE, et al. Investigation of the binding and functional properties of extended length D_3 dopamine receptor-selective antagonists. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25:1448–1461. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.11.013.
• **Evidence of 4-phenylpiperazine D_3R-selective antagonist with enhanced affinity due to binding at both the orthosteric site as well as the secondary binding pocket.**
145. Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, et al. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. CNS Neurolog Disord Drug Targ. 2006;5:25–43. doi:10.2174/187152706784111551.
146. Gross G, Wicke K, Drescher KU. Dopamine D3 receptor antagonism-still a therapeutic option for the treatment of schizophrenia. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2013;386:155–166. doi:10.1007/s00210-012-0806-3.
147. Millan MJ, Brocco M. Cognitive impairment in schizophrenia: a review of developmental and genetic models, and pro-cognitive profile of the optimised D(3) D(2) antagonist, S33138. Therapie. 2008;63:187–229. doi:10.2515/therapie:2008041.
148. Watson DJ, Loiseau F, Ingallinesi M, et al. Selective blockade of dopamine D3 receptors enhances while D_2Receptor antagonism impairs social novelty discrimination and novel object recognition in rats: a key role for the prefrontal cortex. Neuropsychopharmacology. 2012;37:770–786. doi:10.1038/npp.2011.254.
149. Heidbreder C. Rationale in support of the use of selective dopamine D3 receptor antagonists for the pharmacotherapeutic management of substance use disorders. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2013;386:167–176. doi:10.1007/s00210-012-0803-6.
150. Gilbert JG, Newman AH, Gardner EL, et al. Acute administration of SB-277011A, NGB 2904, or BP 897 inhibits cocaine cue-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats: role of dopamine D3 receptors. Synapse. 2005;57:17–28. doi:10.1002/syn.20152.
151. Khaled MA, Araki KF, Li B, et al. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB 277011-A, but not the partial agonist BP 897, blocks cue-induced reinstatement of nicotine-seeking. Int J Neuropsychopharmacol. 2010;13:181–190. doi:10.1017/S1461145709991064.
152. Higley AE, Kiefer SW, Li X, et al. Dopamine D3 receptor antagonist SB-277011A inhibits methamphetamine self-administration and methamphetamine-induced reinstatement of drug-seeking in rats. Eur J Pharmacol. 2011;659:187–192. doi:10.1016/j.ejphar.2011.02.046.
153. D'Souza MS, Markou A. Neuronal mechanisms underlying development of nicotine dependence: implications for novel smoking-cessation treatments. Addict Sci Clin Pract. 2011;6:4–16.
154. De Biasi M, Dani JA. Reward, addiction, withdrawal to nicotine. Annu Rev Neurosci. 2011;34:105–130. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113734.
155. Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P. Increased dopamine D3 receptor expression accompanying behavioural sensitization to nicotine in rats. Synapse. 2003;47:176–183. doi:10.1002/syn.10170.
156. Le Foll B, Schwartz JC, Sokoloff P. Disruption of nicotine conditioning by dopamine D3 receptor ligands. Mol Psychiatry. 2003;8:225–230. doi:10.1038/sj.mp.4001202.
157. Le Foll B, Sokoloff P, Stark H, et al. Dopamine D3 receptor ligands block nicotine-induced conditioned place preferences through a mechanism that does not involve discriminative-stimulus or antidepressant-like effects. Neuropsychopharmacology. 2005;30:720–730. doi:10.1038/sj.npp.1300622.
158. Khaled MA, Pushparaj A, Di Ciano P, et al. Dopamine D3 receptors in the basolateral amygdala and the lateral habenula modulate cue-induced reinstatement of nicotine seeking. Neuropsychopharmacology. 2014;9:3049–3058. doi:10.1038/npp.2014.158.
159. Rice OV, Patrick J, Schonhar CD, et al. The effects of the preferential dopamine D3 receptor antagonist S33138 on ethanol binge drinking in C57BL/6J mice. Synapse. 2012;66:975–978. doi:10.1002/syn.21575.
160. Leggio GM, Camillieri G, Platania CBM, et al. Dopamine D3 receptor is necessary for ethanol consumption: an approach with buspirone. Neuropsychopharmacology. 2014;39:2017–2028. doi:10.1038/npp.2014.51.
161. Thanos PK, Katana JM, Ashby CR Jr., et al. The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011-A attenuates ethanol consumption in ethanol preferring (P) and non-preferring (NP) rats. Pharmacol Biochem Behav. 2005;81:190–197. doi:10.1016/j.pbb.2005.03.013.
162. Bahi A, Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated dopamine D3 receptor modulation in the rat brain impairs alcohol intake and ethanol-induced conditioned place preference. Alcohol Clin Exp Res. 2014;38:2369–2376. doi:10.1111/acer.12503.
163. Le Foll B, Diaz J, Sokoloff P. A single cocaine exposure increases BDNF and D3 receptor expression: implications for drug-conditioning. Neuroreport. 2005;16:175–178.
164. Segal DM, Moraes CT, Mash DC. Up-regulation of D_3 dopamine receptor mRNA in the nucleus accumbens of human cocaine fatalities. Brain Res Mol Brain Res. 1997;45:335–339.
165. Frankel PS, Alburges ME, Bush L, et al. Striatal and ventral pallidum dynorphin concentrations are markedly increased in human chronic cocaine users. Neuropharmacology. 2008;55:41–46. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.04.019.
166. Guillin O, Diaz J, Carroll P, et al. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. Nature. 2001;411:86–89. doi:10.1038/35075076.
167. D'Sa C, Fox HC, Hong AK, et al. Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: a prospective study. Biol Psychiatry. 2011;70:706–711. doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.013.
168. Czoty PW, Nader MA. Effects of dopamine D2/D3 receptor ligands on food-cocaine choice in socially housed male cynomolgus monkeys. J Pharmacol Exp Ther. 2013;344(2):329–338. doi:10.1124/jpet.112.201012.
169. Achat-Mendes C, Platt DM, Newman AH, et al. The dopamine D3 receptor partial agonist CJB 090 inhibits the discriminative stimulus but not the reinforcing or priming effects of cocaine in squirrel monkeys. Psychopharmacology (Berl). 2009;206(1):73–84. doi:10.1007/s00213-009-1581-9.
170. Cheung TH, Nolan BC, Hammerslag LR, et al. Phenylpiperazine derivatives with selectivity for dopamine D3 receptors modulate cocaine self-administration in rats. Neuropharmacology. 2012;63(8):1346–1359. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.08.011.
171. Hachimine P, Seepersad N, Ananthan S, et al. The novel dopamine D3 receptor antagonist, SR21502, reduces cocaine conditioned

place preference in rats. Neurosci Letters. 2014;569:137–141. doi:10.1016/j.neulet.2014.03.055.
• **By PET studies, the authors propose the selective D_3R antagonist GSK598809 as a future therapeutic candidate to treat alcohol abuse.**
172. Vorel SR, Ashby CR Jr, Paul M, et al. Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. J Neurosci. 2002;22:9595–9603.
173. Xi ZX, Gilbert J, Campos AC, et al. Blockade of mesolimbic dopamine D3 receptors inhibits stress-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats. Psychopharmacology (Berl). 2004;176:57–65. doi:10.1007/s00213-004-1858-y.
174. Di Ciano P, Underwood RJ, Hagan JJ, et al. Attenuation of cue-controlled cocaine-seeking by a selective D_3 dopamine receptor antagonist SB-277011-A. Neuropsychopharmacology. 2003;28:329–338. doi:10.1038/sj.npp.1300148.
175. Xi Z-X, Newman AH, Gilbert JG, et al. The novel dopamine D3 receptor antagonist NGB 2904 inhibits cocaine's rewarding effects and cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior in rats. Neuropsychopharmacology. 2006;31:1393–1405. doi:10.1038/sj.npp.1300912.
176. Xi Z-X, Li X, Li J, et al. Blockade of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens and central amygdala inhibits incubation of cocaine craving in rats. Addict Biol. 2013;18:665–677. doi:10.1111/j.1369-1600.2012.00486.x.
177. Appel NM, Li S-H, Holmes TH, et al. Dopamine D3 receptor antagonist (GSK598809) potentiates the hypertensive effects of cocaine in conscious, freely-moving dogs. J Pharmacol Exp Ther. 2015;354(3):484–492. doi:10.1124/jpet.115.224121.
178. Le Foll B, Collo G, Rabiner EA, et al. Dopamine D3 receptor ligands for drug addiction treatment: update on recent findings. Prog Brain Res. 2014;211:255–275. doi:10.1016/B978-0-444-63425-2.00011-8.
•• **The review presents recent findings supporting further exploration of D_3R ligands to treat drug addiction.**
179. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptor. Nature. 2009;459:185–194. doi:10.1038/nature08057.
180. Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, et al. Molecular structures of G-protein-coupled receptors. Nature. 2013;494:185–194. doi:10.1038/nature11896.
181. Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:7682–7687. doi:10.1073/pnas.0611448104.
• **Experimental demonstration that β_2-adrenergic receptor reconstituted in high-density lipoproteins is monomeric and fully functional.**
182. Chabre M, Deterre P, Antonny B. The apparent cooperativity of some GPCRs does not necessarily imply dimerization. Trends Pharmacol Sci. 2009;30:182–187. doi:10.1016/j.tips.2009.01.003.
183. Casadó V, Cortés A, Mallol J, et al. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? Pharmacol Ther. 2009;124:248–257. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.07.005.
• **A two-state dimer receptor model is presented available to interpret data obtained from drugs interacting with GPCR dimers, including cooperative ligands.**
184. Milligan G. G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. Br J Pharmacol. 2009;158:5–14. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00169.x.
•• **The review summarizes key recent to identify ligands that may modulate GPCR heterodimer function selectively.**
185. Ferré S, Baler R, Bouvier M, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. Nat Chem Biol. 2009;5:131–134. doi:10.1038/nchembio0309-131.
•• **With recommendations for receptor heteromer nomenclature and identification in native tissues and their use as targets for drug development.**
186. Ferré S, Navarro G, Casadó V, et al. G-protein coupled receptor heteromers as new targets for drug development. Prog Mol Biol Transl Sci. 2010;91:41–52. doi:10.1016/S1877-1173(10)91002-8.
187. Ferré S, Casadó V, Devi LA, et al. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. Pharmacol Rev. 2014;66:413–434. doi:10.1124/pr.113.008052.
•• **Recent actualization on pharmacological perspectives of GPCR oligomerization.**
188. Albizu L, Cottet M, Kralikova M, et al. Time-resolved FRET between GPCR ligands reveals oligomers in native tissues. Nat Chem Biol. 2010;6:587–594. doi:10.1038/nchembio.396.
•• **Authors demonstrate the presence of GPCR oligomers in native tissues by a time-resolved FRET strategy that is based on receptor labeling with selective fluorescent ligands.**
189. Ciruela F, Fernandez-Dueñas V, Llorente J, et al. G protein-coupled receptor oligomerization and brain integration: focus on adenosinergic transmission. Brain Res. 2012;1476:86–95. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.056.
• **The review shows how formations of adenosine, dopamine and metabotropic glutamate receptors-containing oligomers affect into striatal functioning in both normal and pathological conditions.**
190. Miller LJ, Dong M, Harikumar KG. Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor. Br J Pharmacol. 2012;166:18–26. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01463.x.
191. Calebiro D, Rieken F, Wagner J, et al. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:743–748. doi:10.1073/pnas.1205798110.
192. Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, et al. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. Mol Pharmacol. 2013;84:630–642. doi:10.1124/mol.113.087072.
•• **The results of this study demonstrate that biogenic amine receptors freely diffusing within the plasma membrane are predominantly homodimers.**
193. Maggio R, Aloisi G, Silvano E, et al. Heterodimerization of dopamine receptors: new insights into functional and therapeutic significance. Parkinsonism Relat Disord. 2009;15:52–57. doi:10.1016/S1353-8020(09)70826-0.
194. Milligan G. The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. Curr Opin Pharmacol. 2010;10:23–29. doi:10.1016/j.coph.2009.09.010.
195. Orru M, Bakesova J, Brugarolas M, et al. Striatal pre- and postsynaptic profile of adenosine A_{2a} receptor antagonists. PLoS One. 2011;6:e16088. doi:10.1371/journal.pone.0016088.
•• **This review shows two heteromer-selective drugs, SCH-442416 and KW-6002, for A_1R-A_{2A}R and A_{2A}R-D_2R heteromers, respectively, that may explain the behavioral actions of these compounds.**
196. Smith NJ, Milligan G. Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes. Pharmacol Rev. 2010;62:701–725. doi:10.1124/pr.110.002667.
•• **Authors introduce the concept of allosterism at both GPCR homomers and heteromers.**
197. Casadó-Anguera V, Bonaventura J, Moreno E, et al. Evidence for the heterotetrameric structure of the adenosine A_{2A}-dopamine D_2Receptor complex. Biochem Soc Trans. 2016;44:595–600. doi:10.1042/BST20150276.
198. Casadó V, Ferrada C, Bonaventura J, et al. Useful pharmacological parameters for G-protein-coupled receptor homodimers obtained from competition experiments. Agonist-antagonist binding modulation. Biochem Pharmacol. 2009;78:1456–1463. doi:10.1016/j.bcp.2009.07.012.
• **First evidence and quantification of the agonist-antagonist binding modulation in GPCRs.**
199. Ferré S, Bonaventura J, Tomasi D, et al. Allosteric mechanism within the adenosine A_{2A}-dopamine D_2Receptor heterotetramer.

Neuropharmacology. 2016. Epub 2015 Jun 4. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.05.028.

200. Kenakin T, Miller LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. Pharmacol Rev. 2010;62:265–304. doi:10.1124/pr.108.000992.
201. Nimchinsky EA, Hof PR, Janssen WGM, et al. Expression of dopamine D3 receptor dimers and tetramers in brain and in transfected cells. J Biol Chem. 1997;272:29229–29237.
202. Karpa KD, Lin R, Kabbani N, et al. The dopamine D3 receptor interacts with itself and the truncated D_3 splice variant D_3nf: D_3-D_3nf interaction causes mislocalization of D3 receptors. Mol Pharmacol. 2000;58(4):677–683.
203. Marsango S, Caltabiano G, Pou C, et al. Analysis of human dopamine D3 receptor quaternary structure. J Biol Chem. 2015;12:290 (24):15146–15162. doi:10.1074/jbc.M114.630681

•• **Interesting study about the quaternary structure of the D_3R.**

204. Pou C, Mannoury la Cour C, Stoddart LA, et al. Functional homomers and heteromers of dopamine D_2L and D3 receptors co-exist at the cell surface. J Biol Chem. 2012;287:8864–8878. doi:10.1074/jbc.M111.326678.
205. Shonberg J, Draper-Joyce C, Mistry SN, et al. Structure-activity study of N-((trans)-4-(2-(7-cyano-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl) ethyl)cyclohexyl)-1H-indole-2-carboxamide (SB269652), a bitopic ligand that acts as a negative allosteric modulator of the dopamine D_2Receptor. J Med Chem. 2015;58(13):5287–5307. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00581.
206. Torvinen M, Marcellino D, Canals M, et al. Adenosine A_{2A} receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A_{2A} /D_3 heteromeric complexes. Mol Pharmacol. 2005;67:400–407. doi:10.1124/mol.104.003376.

• **First evidence of A_{2A}R-D_3R heteromerization.**

207. Scarselli M, Novi F, Schallmach E, et al. D_2/D_3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. J Biol Chem. 2001;276:30308–30314. doi:10.1074/jbc.M102297200.

• **First evidence of D_2R-D_3R heteromerization.**

208. Novi F, Millan MJ, Corsini GU, et al. Partial agonist actions of aripiprazole and the candidate antipsychotics S33592, bifeprunox, N-desmethylclozapine and preclamol at dopamine D(2L) receptors are modified by co-transfection of D3 receptors: potential role of heterodimer formation. J Neurochem. 2007;102:1410–1424. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04660.x.
209. Maggio R, Scarselli M, Novi F, et al. Potent activation of dopamine D_3/D_2 heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. J Neurochem. 2003;87:631–641.
210. Maggio R, Scarselli M, Capannolo M, et al. Novel dimensions of D3 receptor function: focus on heterodimerisation, transactivation and allosteric modulation. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25:1470–1479. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.09.016.

•• **The study highlights the binding profiles and mechanisms of interaction with D_3-D_3 homomers and D3-D2 heteromers of different ligands.**

211. Marcellino D, Ferré S, Casadó V, et al. Identification of dopamine D_1-D3 receptor heteromers. Indications for a role of synergistic D_1-D3 receptor interactions in the striatum. J Biol Chem. 2008;283:26016–26025. doi:10.1074/jbc.M710349200.

• **First evidence, parallel to that obtained by ref. 223, of D_1R-D_3R heteromerization.**

212. Fiorentini C, Busi C, Gorruso E, et al. Reciprocal regulation of dopamine D_1 and D3 receptor function and trafficking by heterodimerization. Mol Pharmacol. 2008;74:59–69. doi:10.1124/mol.107.043885.

• **First evidence, parallel to that obtained by ref. 222, of D_1R-D_3R heteromerization.**

213. Cruz-Trujillo R, Avalos-Fuentes A, Rangel-Barajas C, et al. D_3 dopamine receptors interact with dopamine D_1 but not D_4 receptors in the GABAergic terminals of the SNr of the rat. Neuropharmacology. 2013;67:370–378. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.11.032.
214. Guitart X, Navarro G, Moreno E, et al. Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D_1-D3 receptor heterotetramer. Mol Pharmacol. 2014;86:417–429. doi:10.1124/mol.114.093096.

•• **The review shows the first physical evidence for a GPCR heterotetramer.**

215. Solís O, Garcia-Montes JR, González-Granillo A, et al. Dopamine D3 receptor modulates l-DOPA-induced dyskinesia by targeting D1Receptor-mediated striatal signaling. Cereb Cortex. 2016;Epub 2015 Oct 18. doi:10.1093/cercor/bhv231.
216. Farré D, Muñoz AM, Moreno E, et al. Stronger dopamine D_1-receptor-mediated neurotransmission in dyskinesia. Mol Neurobiol. 2015;52:1408–1420. doi:10.1007/s12035-014-8936-x.
217. Guo W, Urizar E, Kralikova M, et al. Dopamine D_2Receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. EMBO J. 2008;27:2293–2304. doi:10.1038/emboj.2008.153.
218. Han Y, Moreira IS, Urizar E, et al. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. Nat Chem Biol. 2009;5:688–695. doi:10.1038/nchembio.199.
219. Schmauss C, Haroutunian V, Davis KL, et al. Selective loss of dopamine D_3-type receptor mRNA expression in parietal and motor cortices of patients with chronic schizophrenia. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;19:8942–8946. doi:10.1073/pnas.90.19.8942.
220. Richtand NM, Liu Y, Ahlbrand R, et al. Dopaminergic regulation of dopamine D3 and D3nf receptor mRNA expression. Synapse. 2010;64(8):634–643. doi:10.1002/syn.20770.
221. Silvano E, Millan MJ, Mannoury la Cour C, et al. The Tetrahydroisoquinoline Derivative SB269,652 Is an Allosteric Antagonist at Dopamine D_3 and D_2Receptors. Mol Pharmacol. 2010;78:925–934.

•• **The study shows SB269,652 as an atypical, allosteric ligand at D_3R and D_2R.**

222. Hettinger BD, Lee A, Linden J, et al. DL ultrastructural localization of adenosine A_{2A} receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. J Comp Neurol. 2001;431:331–346.
223. Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, et al. Adenosine A_{2A} receptors and basal ganglia physiology. Prog Neurobiol. 2007;83:277–292. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.05.001.
224. Cunha RA, Ribeiro JA. Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. Neuropharmacology. 2000;39(7):1156–1167.
225. Cunha RA, Ferré S, Vaugeois JM, et al. Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. Curr Pharm Des. 2008;14:1512–1524.
226. Vidi P-A, Chen J, Irudayaraj JM, et al. Adenosine $A_{(2A)}$ receptors assemble into higher-order oligomers at the plasma membrane. FEBS Lett. 2008;582:3985–3990. doi:10.1016/j.febslet.2008.09.062.
227. Hillefors M, Hedlund PB, Von Euler G. Effects of adenosine $A_{(2A)}$ receptor stimulation in vivo on dopamine D3 receptor agonist binding in the rat brain. Biochem Pharmacol. 1999;58:1961–1964.
228. Canals M, Marcellino D, Fanelli F, et al. Adenosine A_{2A}-dopamine D_2Receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. J Biol Chem. 2003;278:46741–46749. doi:10.1074/jbc.M306451200.
229. Maggio R, Millan MJ. Dopamine D_2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. Curr Opin Pharmacol. 2010;10:100–107. doi:10.1016/j.coph.2009.10.001.
230. Fiorentini C, Savoia P, Bono F, et al. The D_3 dopamine receptor: from structural interactions to function. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25:1462–1469. doi:10.1016/j.euroneuro.2014.11.021.
231. Ballesteros JA, Shi L, Javitch JA. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. Mol Pharmacol. 2001;60:1–19.
232. Gerfen CR. The rat nervous system. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.
233. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, et al. D_1 and D_2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. Science. 1990;250:1429–1432.

234. Heidbreder C. Selective antagonism at dopamine D3 receptors as a target for drug addiction pharmacotherapy: a review of preclinical evidence. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008;7:410–421.
•• **The review states that D_3R could mediate most of the reported interactions between D_1R and D2-like receptors demonstrated at the striatal neuronal level.**
235. Ridray S, Griffon N, Mignon V, et al. Coexpression of dopamine D_1 and D3 receptors in islands of Calleja and shell of nucleus accumbens of the rat: opposite and synergistic functional interactions. Eur J Neurosci. 1998;10:1676–1686.
236. Fiorentini C, Busi C, Spano P, et al. Dimerization of dopamine D_1 and D3 receptors in the regulation of striatal function. Curr Opin Pharmacol. 2010;10:87–92. doi:10.1016/j.coph.2009.09.008.
237. Ferré S, Lluis C, Lanciego JL, et al. Prime time for G-protein-coupled receptor heteromers as therapeutic targets for CNS disorders: the dopamine D_1-D_3 receptor heteromer. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010;9:596–600.
• **The review presents the hypothesis that chronic L-DOPA treatment leads to an increased D_1R signaling, which produces an imbalance in basal ganglia processing.**
238. Bordet R, Ridray S, Schwartz JC, et al. Involvement of the direct striatonigral pathway in levodopa-induced sensitization in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Eur J Neurosci. 2000;12:2117–2123.
239. Niccolini F, Rocchi L, Politis M. Molecular imaging of levodopa-induced dyskinesias. Cell Mol Life Sci. 2015;72:2107–2117. doi:10.1007/s00018-015-1854-x.
240. Staley JK, Mash DC. Adaptive increase in D_3 dopamine receptors in the brain reward circuits of human cocaine fatalities. J Neurosci. 1996;16:6100–6106.
241. Santini E, Valjent E, Usiello A, et al. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal- regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. J Neurosci. 2007;27:6995–7005. doi:10.1523/JNEUROSCI.3105-06.2007.
242. Westin JE, Vercammen L, Strome EM, et al. Spatio temporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1Receptors. Biol Psychiatry. 2007;62:800–810. doi:10.1016/j.biopsych.2006.11.032.
243. Fuxe K, Guidolin D, Agnati LF, et al. Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. Expert Opin Ther Targets. 2015;19(3):377–398. doi:10.1517/14728222.2014.981529.
244. Franco R, Casadó-Anguera V, Muñoz A, et al. Hints on the lateralization of dopamine binding to D1Receptors in rat striatum. Mol Neurobiol. 2016. Epub 2015 Oct 9. doi:10.1007/s12035-015-9468-8.
245. Flagel SB, Clark JJ, Robinson TE, et al. A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. Nature. 2011;4(69):53–57. doi:10.1038/nature09588.
246. Weber B, Schlicker E, Sokoloff P, et al. Identification of the dopamine autoreceptor in the guinea-pig retina as $D_{(2)}$ receptor using novel subtype-selective antagonists. Br J Pharmacol. 2001;133(8):1243–1248. doi:10.1038/sj.bjp.0704192.
247. Bezard E, Ferry S, Mach U, et al. Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D3 receptor function. Nat Med. 2003;9:762–767. doi:10.1038/nm875.
248. Millan MJ, Gobert A, Newman-Tancredi A, et al. S33084, a novel, potent, selective, and competitive antagonist at dopamine $D_{(3)}$-receptors: I. Receptorial, electrophysiological and neurochemical profile compared with GR218,231 and L741,626. J Pharmacol Exp Ther. 2000;293(3):1048–1062.
249. Park WK, Jeong D, Cho H, et al. KKHA-761, a potent D3 receptor antagonist with high 5-HT1A receptor affinity, exhibits antipsychotic properties in animal models of schizophrenia. Pharmacol Biochem Behav. 2005;82(2):361–372. doi:10.1016/j.pbb.2005.09.006.
250. Macdonald GJ, Branch CL, Hadley MS, et al. Design and synthesis of trans-3-(2 (4-((3-(3-(5-methyl-1,2,4oxadiazolyl))phenyl)carboxamido)cyclohexyl)ehthl)-7 methylsulfonyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SB-414796): a potent and selective dopamine D3 receptor antagonist. J Med Chem. 2003;46:4952–4964. doi:10.1021/jm030817d.
251. Micheli F, Bonanomi G, Blaney FE, et al. 1,2,4-triazol-3-yl-thiopropyl-tetrahydrobenzazepines: a series of potent and selective dopamine $D_{(3)}$ receptor antagonists. J Med Chem. 2007;50(21):5076–5089. doi:10.1021/jm0705612.
252. Lenz C, Boeckler F, Hübner H, et al. Analogues of FAUC 73 revealing new insights into the structural requirements of nonaromatic dopamine D3 receptor agonists. Bioorg Med Chem. 2004;12(1):113–117.
253. Grundt P, Carlson EE, Cao J, et al. Novel heterocyclic trans olefin analogues of N-{4-[4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl]butyl}arylcarboxamides as selective probes with high affinity for the dopamine D3 receptor. J Med Chem. 2005;48:839–848. doi:10.1021/jm049465g.
254. Hackling AE, Stark H. Dopamine D3 receptor ligands with antagonist properties. ChemBioChem. 2002;3:946–961. doi:10.1002/1439-7633(20021004)3:10<946::AID-CBIC946>3.0.CO;2-5.
255. Heidbreder CA, Andreoli M, Marcon C, et al. Evidence for the role of dopamine D3 receptors in oral operant alcohol self-administration and reinstatement of alcohol-seeking behavior in mice. Addict Biol. 2007;12:35–50. doi:10.1111/j.1369-1600.2007.00051.x.