



Fundació
La Marató de TV3

20^e SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



RECEPTORES DE CANNABINOIDES HETERÓMEROS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Rafael Franco Fernández

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona

José L. Lanciego Pérez

Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Navarra University.
Pamplona

1. Resumen

El objetivo del proyecto fue evaluar la capacidad de tres receptores acoplados a proteína G (GPCR), expresados en el cuerpo estriado, de formar heterómeros y ser dianas de la enfermedad de Parkinson y, eventualmente, proponer un fármaco de tipo cannabinoide (agonista/antagonista selectivo del heterómero, etc.) que pudiera entrar en ensayos clínicos para la enfermedad.

En primer lugar se investigó la posible heteromerización y el papel fisiológico de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y del GPR55, que se describió como un tercer receptor de cannabinoides, pero posteriormente se "desorfanizó" como receptor de L- α -lisofosfatidilcolina. Nuestros resultados demuestran que GPR55 puede formar heterómeros con receptores CB1 o CB2. La farmacología resultante de estos heterómeros es compleja y nuestros resultados no encajan con que L- α -lisofosfatidilcolina sea el agonista endógeno de GPR55. Tras una caracterización completa de los receptores individuales y los complejos heteroméricos desde el punto de vista de la afinidad de unión y la señalización, también teniendo en cuenta lo que se conoce como agonismo sesgado, se seleccionó un fitocannabinoide, cannabidiol (CBD). A concentraciones nanomolares, el compuesto actuó como receptor alostérico negativo del receptor CB2. Otro hallazgo relevante se relacionó con la expresión de heterómeros en la microglía activada, surgiendo así la posibilidad de que los receptores de cannabinoides en microglía sean dianas terapéuticas para la neuroprotección, es decir, para inducir el fenotipo neuroprotector (M2).

En el modelo que más se asemeja a la patología humana, *Macaca fascicularis*, tratado con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), se encontraron heterómeros de receptores con expresión diferencial de los animales controles y no discinéticos comparados con animales discinéticos tratados con MPTP. El cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG), otro fitocannabinoide (caracterizado en el marco del proyecto), se probaron en animales tratados con MPTP y los resultados fueron bastante notables. Por un lado, CBD (no CBG) pudo mejorar las puntuaciones motoras de los animales parkinsonianos. Por otro lado, CBD (no CBG) también fue capaz de mejorar la discinesia en animales parkinsonianos tratados crónicamente con levodopa, que a la larga produce discinesias en el paciente humano.

En conjunto, estos resultados muestran que los moduladores alostéricos de los receptores de cannabinoides pueden ser útiles en la terapia de la enfermedad de Parkinson y que los heterómeros que contienen receptores de cannabinoides en la microglía son dianas potenciales de neuroprotección.

2. Resultados

Ensayos *in vitro*

Tras las clonaciones pertinentes y obtener los diferentes plásmidos se demostró, en un sistema de expresión heterólogo, que el receptor GPR55 puede formar heterómeros con receptores CB1 (CB1R) o CB2 (CB2R). En el último periodo de la primera anualidad se identificó el trímero formado por los receptores CB1, CB2 y GPR55 mediante la técnica de SRET (*sequential BRET-FRET technique*). Se demostró asimismo la formación de complejos tetraméricos de CB1R y CB2R, pero no para otras combinaciones de los receptores en estudio.

Se demostró una interacción entre CB₂R con el receptor huérfano GPR18 que, en base a resultados recientes, es importante para la regulación del sistema endocannabinoide, así como la no interacción entre los CB₁R y GPR18. Se han analizado las consecuencias funcionales de este nuevo complejo CB₂R-GPR18 que ayudarían a un mejor conocimiento de las complejidades subyacentes en el sistema endocannabinoide.

Se puso a punto el método para obtener cultivos primarios y se cuantificó la expresión de receptores tanto en cultivos como en muestras de tejido neurológico (mediante la técnica: *in situ proximity ligation assay*: PLA). Previamente se validaron los anticuerpos anti-CB₁R, anti-CB₂R y anti-GPR55 adecuados para realizar experimentos de inmunohistoquímica y de inmunocitoquímica y PLA. La conclusión es que los heterómeros se encuentran en todas las condiciones, si bien (como se indica más abajo) hay expresión diferencial en condiciones parkinsonianas y/o en discinesia inducida por la "terapia" con levodopa.

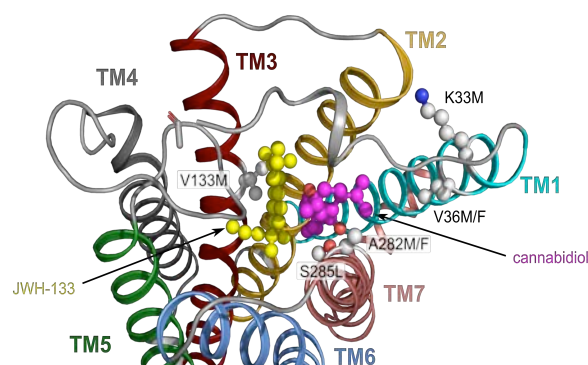
Se diseñó y sintetizó un compuesto selectivo para CB₂R que está conjugado a un fluoróforo y que permitió efectuar ensayos de unión (*binding*) en células vivas y de manera homogénea (HTRF). Los ensayos de HTRF han permitido detectar un segundo estado de afinidad del receptor CB₂R que no había sido descrito anteriormente. Se

confirmó, usando minigenes que afectan al acoplamiento GPCR-proteína G, que el acoplamiento de CB₁R y de CB₂R a proteína Gi se produce en cualquier contexto heteromérico de los planteados en el proyecto. Obtuvimos evidencia de que los resultados atípicos que se han encontrado para algunos de los compuestos usados no se deben a un acoplamiento múltiple o parcial a proteína Gs, sino a un centro alostérico. Descubrimos que el tetrahidrocannabinol (THC) no es capaz de acoplar CB₁R a Gi y ello podría ser uno de los motivos de sus efectos psicotrópicos. Uno de los resultados relevantes, por inesperado y positivo (*in vitro* e *in vivo*), fue descubrir que el cannabidiol (CBD) se comporta como modulador alostérico de CB₂R a concentraciones nM (puede ir a centro ortostérico a concentraciones en rango μM). Un centro alostérico en CB₁R para CBD se reportó en 2015 en otro laboratorio. La existencia de estos centros para CBD "nuevos", ya que no estaban descritos cuando se presentó el presente proyecto, se tuvo en cuenta en los ensayos de funcionalidad. A partir de haber caracterizado la señalización del heterómero, incluso estudiando el *biased agonism* en CB₁R, CB₂R o CB₁-CB₂Hets, se modificó la estrategia original; en particular en base a la poca fiabilidad de los agonistas del receptor GPR55 y al desarrollo de nuevos ligandos por parte del grupo de la Dr. Nagerovic del CSIC de Madrid que proporcionó ligandos mono y bivalentes CB₂R. En *binding* radioactivo ninguno de los compuestos monovalentes era capaz de competir por la unión al receptor en membranas aisladas; sin embargo, usando el método desarrollado por nuestro laboratorio había unión de ligandos tanto monovalentes como bivalentes (se omiten estructuras porque hay posibilidad de solicitud de patente). Los ligandos bivalentes modularon de manera multifactorial la funcionalidad de CB₂R y la hipótesis más razonable es que se debe a una interacción de carácter bitópico. Todos los datos han ayudado a delinear los aminoácidos que interaccionan con el farmacóforo del ligando bivalente.

Los experimentos de señalización se llevaron a cabo en células que expresaban el CB₂R (*full-length/wild type*) o un receptor con mutaciones puntuales en lugares de unión potencial de moléculas que actúan de forma alostérica y/o bitópica. Los mutantes del receptor que se desarrollaron fueron: Mut 1 K3.28----Alanina; Mut 3 S6.58----Alanina y Mut 4 S7.39----Alanina. Los resultados mostraron que los mutantes 1 y 4 dan información diferencial que puede ayudar a mapear los residuos que participan en la unión. Es preciso señalar que el CB₂R forma homodímeros (datos generados a lo largo del presente proyecto) y que si bien los agonistas canónicos, como los ligandos

monovalentes, se unen a una sola molécula de CB₂R, los ligandos bivalentes pueden estar a caballo entre dos moléculas de CB₂R que formen un dímero. Hacia el final del proyecto se generó el modelo de la figura (colaboración con L. Pardo y A. Cordero, UAB):

Modelo molecular del receptor CB₂ en complejo con el agonista JWH-133 y con cannabidiol (esferas sólidas en amarillo y magenta, respectivamente). Los residuos mutados a Alanina también se indican como esferas sólidas, y las modificaciones que inducen se muestran por las diferencias estructurales de las hélices (dominios transmembrana, en color). El modelo está siendo refinado en base a los datos de la elucidación de la estructura de CB₂R (Li *et al.*, Cell, enero de 2019; 10.1016/j.cell.2018.12.011)



Ensayos en *Macaca fascicularis*

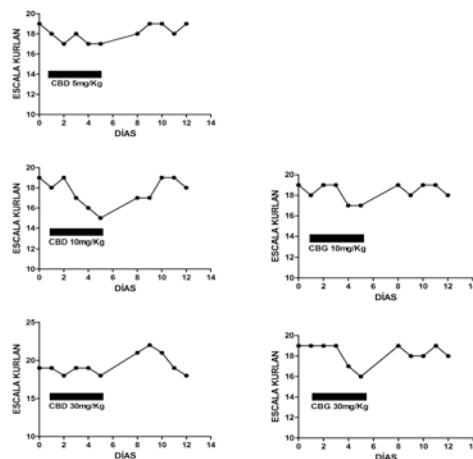
La depleción dopaminérgica se consiguió utilizando MPTP en un total de 9 primates. El estado parkinsoniano alcanzado fue estable y no reversible con una puntuación en escala de Kurlan que osciló entre 16 y 24. El nivel de denervación en 3 animales, mediante estudios de neuroimagen con microPET utilizando ¹¹C-dihidotetrabenazina, osciló entre el 72% y el 81%. Algunos animales necesitaron un tratamiento más prolongado con MPTP para adquirir un estado parkinsoniano irreversible. Los animales parkinsonianos fueron tratados (oralmente) con levodopa (bajo un régimen crónico). Los animales tratados con levodopa se estratificaron en discinéticos y no discinéticos. Se realizaron ensayos de base inmunológica en cerebros obtenidos de animales perfundidos. Para identificar las neuronas de proyección, los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica mediante la inyección de un marcador retrógrado (BDA 3 kDa) en las subdivisiones externas e internas del globo pálido.

Después de completar el procesamiento histológico, fue posible demostrar la exactitud del lugar de deposición de los trazadores administrado por cirugía estereotáxica, así como la presencia de heterómeros CB1-GPR55 y CB2-GPR55 en las áreas de interés del cerebro (núcleos de caudado y putamen), así como en las subdivisiones: *core* y

shell del núcleo accumbens. También hemos obtenido datos diversos sobre su distribución subcelular mediante microscopía electrónica, datos que por ahora solo se refieren a receptores individuales y no a configuración heteromérica. La cuantificación realizada se ha centrado en 3 parámetros principales, a saber: (i) densidad total de heterómeros por territorio, (ii) densidad neuronal promedio por célula única y (iii) porcentaje de células por territorio con o sin expresión de heterómeros. También se completó la caracterización por identificación de los diferentes tipos de células donde se expresan los heterómeros (neuronas de proyección y diferentes tipos de interneuronas en las áreas de interés). Los datos obtenidos muestran una mayor densidad de heterómeros CB1-GPR55 que de CB2-GPR55 en todas las subdivisiones analizadas. Considerando cada heterómero individualmente, la densidad más elevada se encontró en el *shell* del núcleo accumbens, seguido por el *core* de este núcleo. Los territorios postcomisurales de putamen y caudado presentaron una mayor densidad de ambos tipos de heterómeros en comparación con las áreas precomisurales de ambas divisiones. En animales parkinsonianos hay un aumento en la densidad de los receptores heteroméricos en los núcleos caudado y putamen, preponderantemente en sus territorios postcomisurales, mientras que ambas subdivisiones del núcleo accumbens reflejaron cambios menores que no alcanzaron significación estadística (teniendo en cuenta que la inervación dopaminérgica del núcleo accumbens proviene principalmente del área ventral tegmental, cuyas neuronas dopaminérgicas son mucho menos vulnerables a la neurodegeneración inducida por el MPTP, es decir, es una inervación más preservada y, por lo tanto, sufre un impacto menor respecto al número de heterómeros cuantificados). Todos estos cambios ascendentes en la densidad territorial de los receptores endocannabinoides se normalizaron tras tratamiento crónica con levodopa a los niveles observados en los animales controles. Para validar los resultados obtenidos de manera independiente, se repitió toda la tinción realizada con los heterómeros CB1-GPR55 y CB2-GPR55, procediendo a enviar las muestras histológicas al laboratorio del Dr. Franco en la Universidad de Barcelona (analizadas allí en doble ciego).

Finalmente, los animales fueron tratados con CBD y CBG. Debido a la limitación de espacio, solo se incluye en este informe las gráficas resultantes de uno de estos experimentos. Se muestra el efecto de CBD (a diferentes concentraciones) en las puntuaciones motoras del modelo parkinsoniano. El panel correspondiente a 10 mg/Kg (administración oral) indica una reducción sostenida de las puntuaciones motoras (es decir, efecto antiparkinsoniano) que duró algunos días después del cese del tratamiento. Este resultado podría respaldar un ensayo clínico sobre el uso de CBD (un

compuesto muy seguro) en la terapia de pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson (ver más abajo).



3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

Este proyecto proporciona evidencia de receptores de cannabinoides y de complejos heterómeros que contienen receptores de cannabinoides en el cuerpo estriado de modelos de enfermedad de Parkinson y de la existencia de variaciones de la expresión en diferentes fases de la enfermedad. La presencia de receptores y los resultados *in vitro* indican que se pueden considerar dianas de esta enfermedad.

Desde una perspectiva más terapéutica, el CBD, que es un producto natural que modula el efecto de los cannabinoides endógenos, es eficaz en el modelo de Parkinson más próximo a los humanos: el primate *Macaca fascicularis* tratado con neurotóxico: 1-metil-4-fenil-1,2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Desde el punto de vista de la enfermedad humana, los resultados en los primeros años de desarrollo del proyecto culminaron en un resultado relevante que puede conducir a la promoción de ensayos clínicos con pacientes de Parkinson. La intervención consistiría en probar tanto si el CBD tiene efectos beneficiosos a nivel motor como si reduce/elimina las discinesias causadas como resultado de la terapia con levodopa. Según nuestros datos, deben analizarse varias concentraciones (en mg/kg) del

compuesto. Cabe señalar que el compuesto es seguro, lo cual es esencial para la aprobación de un nuevo medicamento por parte de la Food and Drug Administration (FDA) estadounidense. Efectivamente, la FDA ha aprobado Epidiolex® (preparación de CBD en aceite de sésamo; www.epidiolex.com/) para el tratamiento de la epilepsia infantil. Cabe destacar que existe una propuesta para realizar ensayos clínicos para el uso de CBD en neonatos en casos de hipoxia.

Nuestros datos también permiten el diseño de nuevos compuestos (de síntesis) que sean más potentes que el CBD. En este sentido y tras las recientes elucidaciones de las estructuras tridimensionales de los receptores de cannabinoides, hemos localizado la zona probable de la unión alostérica del CBD. Este hecho permitirá el diseño, en colaboración con la Dra. Jagerovic del CSIC (Instituto de Química Médica de Madrid) de nuevos compuestos sintéticos con potencial terapéutico.

En resumen, los resultados del proyecto permiten sugerir un nuevo (*first in class*) fármaco para combatir el Parkinson y proporcionar información para diseñar nuevas moléculas que, a través de los receptores de cannabinoides, puedan combatir el Parkinson y/o la neurodegeneración asociada a esta u otra enfermedad neurodegenerativa.

4. Bibliografía científica generada

1. Navarro G, Morales P, Rodríguez-Cueto C, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N, Franco R. Targeting Cannabinoid CB2 Receptors in the Central Nervous System. Medicinal Chemistry Approaches with Focus on Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 2016 Sep 13;10:406. doi: 10.3389/fnins.2016.00406. IF= 3,8 Q2. Citas: 28
2. Franco R, Martínez-Pinilla E, Lanciego JL, Navarro G. (2016). *Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization.* *Frontiers in Pharmacology*, 7:76. IF=4,4 Q1. Citas: 40

3. Martínez-Pinilla E, Rabal O, Reyes-Resina I, Zamarbide M, Navarro G, Sánchez-Arias JA, de Miguel I, Lanciego JL, Oyarzabal J, Franco R. (2016).

Two affinity sites of the cannabinoid subtype 2 receptor identified by a novel homogeneous binding assay.

J Pharmacol Exp Ther 358(3): 580-587. IF=3.9 Q1. Citas: 5

4. Rico AJ, Dopeso-Reyes IG, Martínez-Pinilla E, Sucunza D, Pignataro D, Roda E, Marín-Ramos D, Labandeira-García JL, George SR, Franco R, Lanciego JL. (2017).

Neurochemical evidence supporting dopamine D1-D2 receptor heteromers in the striatum of the long-tailed macaque: changes following dopaminergic manipulation.

Brain Struct Funct 222(4):1767-1784. IF=4,2 Q1. Citas: 13

5. Martínez-Pinilla E, Varani K, Reyes-Resina I, Angelats E, Vincenzi F, Ferreiro-Vela C, Oyarzábal J, Canela EI, Lanciego JL, Nadal X, Navarro G, Borea PA, Franco R. (2017).

Binding and signaling studies disclose a potential allosteric site for cannabidiol in cannabinoid CB2 receptors.

Front Pharmacol, 8:744. IF=3,8 Q1. Citas: 17

6. Pignataro D, Sucunza D, Rico AJ, Dopeso-Reyes IG, Roda E, Rodríguez-Pérez AI, Labandeira-García JL, Kato S, Kobayashi K, Lanciego JL. (2017).

Gene therapy approaches in the non-human primate model of Parkinson's disease.

J Neural Transm, 125(3):575-589. IF=2,8 Q2. Citas: 5

7. Reyes-Resina I, Aguinaga D, Labandeira-García JL, Lanciego JL, Navarro G, Franco R. (2018).

Usefulness of identifying G-protein-coupled receptor dimers for diagnosis and therapy of neurodegenerative diseases and of gliomas.

Histol Histopathol, 33(9):909-917. IF=2,0 Q2. Citas: 0

8. Navarro G, Borroto-Escuela D, Angelats E, Etayo I, Reyes-Resina I, Pulido-Salgado M, Rodríguez-Pérez AI, Canela EI, Saura J, Lanciego JL, Labandeira-García JL, Saura CA, Fuxe K, Franco R. (2018).

Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. Brain Behav Immun 67:139-151. IF= 6,3 Q1. Citas: 17

9. García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Navarro G, Reyes-Resina I, Franco R, Lanciego JL, Giner S, Manzanares J. (2018).

Alterations in gene and protein expression of cannabinoid CB2 and GPR55 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of suicide victims.

Neurotherapeutics, 15:796-806. IF=5,7 Q1. Citas: 2

10. Navarro G, Reyes-Resina I, Rivas-Santisteban R, Sánchez de Medina V, Morales P, Casano S, Ferreiro-Vera C, Lillo A, Aguinaga D, Jagerovic N, Nadal X, Franco R.

Cannabidiol skews biased agonism at cannabinoid CB1 and CB2 receptors with smaller effect in CB1-CB2 heteroreceptor complexes.

Biochem Pharmacol. 2018 Nov;157:148-158. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.046. Epub 2018 Sep 6. IF=4,2 Q1. Citas: 2

11. Reyes-Resina I, Navarro G, Aguinaga D, Canela EI, Schoeder CT, Załuski M, Kieć-Kononowicz K, Saura CA, Müller CE, Franco R.

Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases.

Biochem Pharmacol. 2018 Nov;157:169-179. doi: 10.1016/j.bcp.2018.06.001. Epub 2018 Jun 2. IF=4,2 Q1. Citas: 2

12. Navarro G, Varani K, Reyes-Resina I, Sánchez de Medina V, Rivas-Santisteban R, Sánchez-Carnerero Callado C, Vincenzi F, Casano S, Ferreiro-Vera C, Canela EI, Borea PA, Nadal X, Franco R.

Cannabigerol Action at Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors and at CB1-CB2 Heteroreceptor Complexes.

Front Pharmacol. 2018 Jun 21;9:632. doi: 10.3389/fphar.2018.00632. IF=3,8 Q1. Citas: 1

13. Martínez-Pinilla E, Aguinaga D, Navarro G, Rico AJ, Oyarzábal J, Sánchez-Arias JA, Lanciego JL, Franco R. (2019).

Targeting CB1 and GPR55 endocannabinoid receptors as a potential neuroprotective approach for Parkinson's disease.

Mol Neurobiol, in press. Doi: 10.1004/s12035-019-1495-4. IF=5.1 Q1. En prensa. Citas: 0

Tesis doctorales (todas con *mención europea*)

Autor: Iñigo Etayo Labiano. Año: 2018

Título: *Interrelaciones moleculares y funcionales entre los receptores cannabinoides; CB1, CB2 y GPR55.*

Directores: Rafael Franco & Gemma Navarro

Autora: Irene Reyes Resina. Año: 2018

Título: *GPR55, CB1 and CB2 receptor heteromers. From cell signalling to pharmacology.* Directores: Rafael Franco & Gemma Navarro

Autor: Edgar Angelats Canals. Año: 2018

Título: *Relevant molecular and functional G-protein coupled receptors interactions in neuroinflammation and addiction.*

Directores: Gemma Navarro & Rafael Franco