



**Fundació**  
La Marató de TV3

20è SIMPOSIUM  
Malalties neurodegeneratives



## **RECEPTORS DE CANNABINOIDES HETERÒMERS COM A DIANES TERAPÈUTIQUES EN LA MALALTIA DE PARKINSON**

### **Rafael Franco Fernández**

Departament De Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Biologia.  
Universitat de Barcelona

### **José L. Lanciego Pérez**

Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra.  
Pamplona.

## 1. Resum

L'objectiu del projecte era avaluar el potencial de tres receptors acoblats a la proteïna G, per formar heteròmers i com a dianes de la malaltia de Parkinson i, finalment, proposar un medicament de tipus cannabinoide (agonista/antagonista selectiu d'heteròmer, etc.) que pogués entrar en assajos clínics de la malaltia.

En primer lloc vam investigar l'heteromerització i el paper fisiològic potencial dels receptors de cannabinoïdes CB1 i CB2 i del GPR55, que es va descriure per primera vegada com a tercer receptor de cannabinoïdes, però es va "desorfanitzar" com a receptor de l'L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina. Els nostres resultats demostren que el GPR55 pot formar heteròmers amb receptors CB1 o CB2. La farmacologia resultant d'aquests heteròmers és complexa i els nostres resultats no s'adapten al fet que l'L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina sigui l'agonista endogen del GPR55. Després d'una caracterització completa dels receptors individuals i dels complexos heteromèrics des del punt de vista de l'afinitat i la senyalització, tenint en compte també el que s'anomena agonisme parcial, s'ha seleccionat un fitocannabinoide, cannabidiol (CBD). A les concentracions nanomolars, el compost va actuar com a modulador al·lostèric negatiu del receptor CB2. Un altre descobriment rellevant va estar relacionat amb l'expressió d'heteròmers a la micròglia activada, que va permetre proposar els receptors de cannabinoïdes com a dianes terapèutiques per induir les cèl·lules a expressar el fenotip neuroprotector (M2).

En el model que imita més de prop la patologia humana, *Macaca fascicularis*, tractat amb 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), es van trobar amb una expressió diferencial en els diferents animals: tractats amb MPTP i levodopa, discinètics i no discinètics. El cannabidiol (CBD) i el cannabigerol (CBG), un altre fitocannabinoide (caracteritzat en el marc del projecte), es van provar en animals tractats amb MPTP i els resultats van ser bastant notables. D'una banda, el CBD (no CBG) va ser capaç de millorar les puntuacions motrius dels animals parkinsonians. D'altra banda, el CBD (no CBG) també va ser capaç de millorar la discinèsia en animals parkinsonians amb tractament crònic amb levodopa, que a la llarga produeix discinèsia en el pacient humà.

En conjunt, aquests resultats mostren que els moduladors al·lostèrics dels receptors de cannabinoïdes poden ser útils en la teràpia de la malaltia de Parkinson i que els

heteròmers que contenen un receptor de cannabinoides en microglia són dianes potencials per aconseguir neuroprotecció.

## 2. Resultats

### **Assaigs *in vitro***

Després de fer les clonacions adients i obtenir els diferents plàsmids, es va demostrar, en un sistema d'expressió heteròleg, que el receptor GPR55 pot formar complexos heteromèrics amb els receptors CB1 (CB1R) o CB2 (CB2R). En l'últim període del primer any, el trímer format pels receptors CB1, CB2 i GPR55 es va identificar mitjançant SRET (tècnica seqüencial BRET-FRET). També es va demostrar la formació de complexos tetramèrics de CB1R i CB2R, però no per a altres combinacions dels receptors estudiats.

Es va demostrar una interacció entre CB2R i el receptor orfe GPR18, que, a partir dels resultats recents, és important per a la regulació del sistema endocannabinoide. També es va demostrar la manca d'interacció entre CB1R i GPR18. Hem analitzat les característiques funcionals d'aquest nou complex CB2R-GPR18 que poden ajudar a un millor coneixement de les complexitats del sistema endocannabinoide.

Es va posar a punt el mètode per obtenir cultius primaris i es va quantificar l'expressió de receptors en cultius i en mostres de teixits neurològics (utilitzant la tècnica: assaig *in situ* de lligació per proximitat: PLA). De manera prèvia s'havien validat els anticossos anti-CB1R, anti-CB2R i anti-GPR55 que van permetre realitzar experiments immunohistoquímics i immunocitoquímics i de PLA. La conclusió és que els heteròmers es troben en totes les condicions, encara que (com s'indica més endavant) hi hagi una expressió diferencial en condicions parkinsonianes i/o en discinèsia induïda per "teràpia" amb levodopa.

Hem dissenyat i sintetitzat un compost selectiu per a CB2R que es conjuga amb un fluoròfor i que permet realitzar assajos d'unió (*binding*) en cèl·lules vives i de manera homogènia (HTRF). Els assajos HTRF van permetre detectar un segon estat d'afinitat del receptor CB2R que no s'havia descrit anteriorment. Es va confirmar, utilitzant minigens que afecten l'acoblament GPCR-proteïna G, que CB1R i CB2R es van acoblar

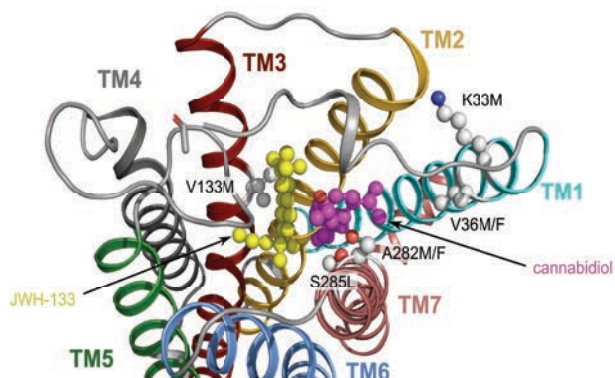
a la proteïna Gi en qualsevol context heteromèric dels identificats al llarg del projecte. Hem obtingut proves que els resultats atípics que s'han trobat per a alguns dels compostos utilitzats no són deguts a un acoblament múltiple o parcial a la proteïna Gs, sinó a un centre al·lostèric. Vam descobrir que el tetrahidrocannabinol (THC) no és capaç d'acoblar CB1R amb Gi i això podria ser un dels motius dels seus efectes psicotròpics. Un dels resultats rellevants a causa del caràcter inesperat i positiu (*in vitro* i *in vivo*) va ser el descobriment que el cannabidiol (CBD) es comporta com un modulador al·lostèric de CB2R a concentracions nM (pot anar al centre ortostèric a concentracions del rang  $\mu$ M). Un centre al·lostèric per al CBD a CB1R va ser reportat el 2015 per un altre laboratori. En les proves de funcionalitat es va tenir en compte l'existència d'aquests centres "nous", ja que no s'havien descrit quan es va escriure aquest projecte.

A partir de la caracterització de la senyalització de l'heteròmer, fins i tot estudiant l'agonisme esbiaixat a CB1R, CB2R o CB1-CB2Hets, es va modificar l'estratègia original; en particular basant-se en la manca de fiabilitat dels agonistes del receptor GPR55 i en el desenvolupament de nous lligands pel grup del Dr. Nagerovic del CSIC de Madrid que va proporcionar lligands CB2R monovalents i bivalents. En assaigs de *binding* amb lligands radioactius, cap dels compostos monovalents no va poder competir per la unió dels receptors a les membranes aïllades; tanmateix, utilitzant el mètode desenvolupat pel nostre laboratori, hi havia una unió de lligands monovalents i bivalents (les estructures s'ometen perquè hi ha la possibilitat d'una sol·licitud de patent). Els lligands bivalents van modular la funcionalitat de CB2R de manera multifactorial, i la hipòtesi més raonable és que es deu a una interacció de tipus bitòpic. Totes les dades han ajudat a delinear els aminoàcids que interactuen amb el farmacòfor del lligand bivalent.

Els experiments de senyalització es van dur a terme en cèl·lules que expressaven el CB2R (*full-length/wild type*) o un receptor amb mutacions puntuals en llocs d'unió potencial de molècules que actuen de forma al·lostèrica i/o bitòpica. Els mutants van ser: Mut 1 K3.28 ---- Alanine; Mut 3 S6.58 ---- Alanine i Mut 4 S7.39 ---- Alanine. Els resultats van mostrar que els mutants 1 i 4 proporcionen informació diferencial que pot ajudar a mapar els residus implicats en la unió. Cal assenyalar que CB2R forma homodímers (dades generades al llarg d'aquest projecte) i que si bé els agonistes canònics, com els lligands monovalents, s'uneixen a una única molècula de CB2R, els

l·ligands bivalents poden estar a mig camí entre dues molècules de CB2R que formen un dímer. Cap al final del projecte es va generar el model de la figura (col·laboració amb Pardo i A. Cordero, UAB):

Model molecular del receptor CB2 en complex amb l'agonista JWH-133 i cannabidiol (esferes sòlides en groc i magenta, respectivament). Els residus mutats a alanina també s'indiquen com a esferes sòlides, i les modificacions que indueixen es mostren per les diferències estructurals de les hèlixs (dominis transmembrana, en color). El model s'està perfeccionant a partir de les dades de l'elucidació de l'estructura de CB2R (Li *et al.*, Cell, gener de 2019, 10.1016/j.cell.2018.12.011).



### **Assaigs en *Macaca fascicularis***

La depleció dopaminèrgica es va induir utilitzant MPTP en un total de 9 primats. L'estat de parkinsonià aconseguit va ser estable i no reversible amb una puntuació a l'escala de Kurlan que oscil·lava entre els 16 i els 24 punts. La denervació dopaminèrgica en 3 animals, mitjançant estudis de neuroimatge microPET amb <sup>11</sup>C-dihidrotetrabenazina, es va estimar entre el 72% i el 81%. Alguns animals van necessitar un tractament més llarg amb MPTP per adquirir un estat parkinsonià irreversible. Els animals parkinsonians van ser tractats (oralment) amb levodopa (sota un règim crònic). Els animals tractats amb levodopa es van estratificar en discinètics i no discinètics.

Els assajos basats en immunologia es van realitzar en cervells obtinguts a partir d'animals perfosos. Per identificar les neurones de projecció, els animals van ser sotmesos a una cirurgia estereotàtica injectant un traçador retrògrad (BDA 3 kDa) en les subdivisions externes i internes del globus pà·lid.

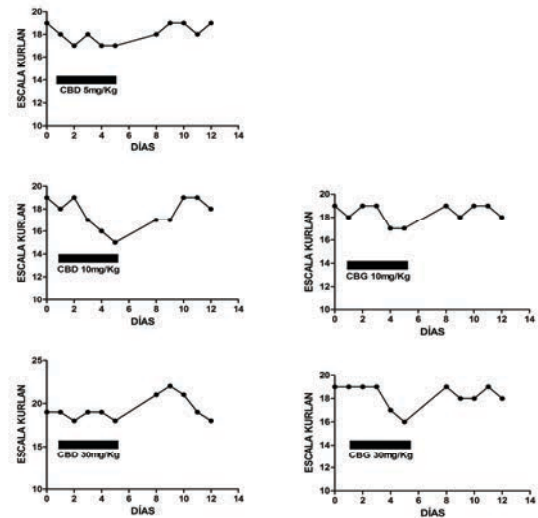
Després de completar el processament histològic, s'ha pogut demostrar la precisió de la col·locació dels traçadors, així com la presència d'heteròmers CB1-GPR55 i CB2-GPR55 a les àrees d'interès del cervell (nuclis caudat i putamen), així com a les subdivisions del *core* i *shell* del nucli accumbens. També hem obtingut diverses dades sobre la seva distribució subcel·lular mitjançant microscòpia electrònica; de moment

les dades només es refereixen a receptors individuals i no a configuració heteromèrica. La quantificació realitzada s'ha centrat en 3 paràmetres principals, que són: (i) densitat total d'heteròmers per territori, (ii) densitat neuronal mitjana per cèl·lula única i (iii) percentatge de cèl·lules per territori amb o sense expressió d'heteròmers. També es va completar la caracterització identificant els diferents tipus de cèl·lules en què s'expressen aquests heteròmers (neurons de projecció i diferents tipus d'interneurons a les àrees d'interès). Les dades obtingudes mostren una densitat més gran d'heteròmers CB1-GPR55 que de CB2-GPR55 en totes les subdivisions analitzades. Considerant cada heteròmer individualment, la seva densitat més alta s'ha trobat al *shell* del nucli accumbens, seguit del *core* d'aquest nucli. Els territoris postcomissurals de putamen i caudat presentaven una major densitat d'aquests dos tipus d'heteròmers en comparació amb les àrees precomissurals d'ambdues divisions. En animals parkinsonians hi ha un augment de la densitat de receptors heteromèrics en els nuclis caudat i putamen, preponderantment en els seus territoris postcomissurals, mentre que les dues subdivisions del nucli accumbens van reflectir canvis menors que no van aconseguir significació estadística. La inervació dopaminèrgica del nucli accumbens prové majoritàriament de l'àrea tegmental ventral, les neurones dopaminèrgiques de les quals són molt menys vulnerables a la neurodegeneració induïda per MPTP, és a dir, és una inervació més preservada i, per tant, presenta un menor impacte amb referència al nombre d'heteròmers quantificats. Tots aquests increments en la densitat territorial dels receptors endocannabinoides es van normalitzar a nivells observats en animals controls després d'un tractament crònic amb levodopa. Per validar els resultats obtinguts de manera independent, es va repetir tota la tinció realitzada amb els heteròmers CB1-GPR55 i CB2-GPR55, i enviant les mostres histològiques al laboratori del Dr. Franco a la Universitat de Barcelona (analitzades allà amb prova de doble cec).

Finalment els animals van ser tractats amb CBD i CBG. A causa de la limitació d'espai, només s'inclou la figura resultant d'un d'aquests experiments en aquest informe. La figura resumeix l'efecte del CBD (a diferents concentracions) sobre les puntuacions motrius del model parkinsonià. El panell

corresponent a 10 mg/Kg (administració oral) va provocar una reducció sostinguda de les puntuacions motrius (és a dir, efecte antiparkinsonià), que va durar alguns dies després de cessar el tractament. Aquest resultat podria abonar un assaig clínic per utilitzar CBD (un compost molt segur) en la teràpia

de pacients amb malaltia de Parkinson (vegeu més endavant).



### 3. Rellevància i possibles implicacions futures

Aquest projecte proporciona evidència de receptors de cannabinoides i heteròmers que contenen receptors de cannabinoides en l'estriat dels models de malaltia de Parkinson i que hi ha una variació de l'expressió en les diferents fases de la malaltia. La presència de receptors a les àrees d'interès i els resultats *in vitro* indiquen que són dianes terapèutiques d'aquesta malaltia.

Des d'una perspectiva més terapèutica, el CBD, que és un producte natural que modula l'efecte dels cannabinoides endògens, és efectiu en el model de Parkinson més proper als humans: el primat *Macaca fascicularis* tractat amb el neurotòxic 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Des del punt de vista de la malaltia humana, els resultats dels primers anys de desenvolupament del projecte van culminar amb un resultat bastant rellevant que pot conduir de manera immediata a la presentació d'assajos clínics amb pacients de Parkinson. La intervenció consistiria a comprovar si el CBD té efectes beneficiosos tant pel que fa a nivell motriu com a la reducció/eliminació de les discinèsies provocades per la teràpia amb levodopa. Segons les nostres dades, s'haurien de provar diverses concentracions (en mg/kg) del compost. Cal destacar que el compost és segur, ja que la seguretat és essencial per a l'aprovació d'un nou fàrmac per part de la Food and Drug Administration (FDA) dels Estats Units. Efectivament, l'FDA ha aprovat

Epidiolex® (preparació de CBD en oli de sèsam; [www.epidiolex.com/](http://www.epidiolex.com/)) per al tractament de l'epilèpsia infantil. Cal destacar que hi ha una proposta per dur a terme assajos clínics per a l'ús de CBD en els nounats en casos d'hipòxia.

Les nostres dades també permeten dissenyar nous compostos (de síntesi) més potents que el CBD. En aquest sentit i després de les recents determinacions de les estructures tridimensionals dels receptors de cannabinoides, hem localitzat la zona probable de la unió al·lostèrica del CBD. Aquest fet permetrà el disseny, en col·laboració amb la Dra. Jagerovic del CSIC (Instituto de Química Médica de Madrid) de nous compostos sintètics amb potencial terapèutic.

En resum, els resultats del projecte ens permeten provar un nou tractament (de primera classe) per combatre el Parkinson i proporcionar informació per dissenyar noves molècules que, a través de receptors de cannabinoides, poden combatre el Parkinson i/o la neurodegeneració associada a aquesta o a altres malalties neurodegeneratives.

#### 4. Bibliografia 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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. Citacions: 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 premsa. Citacions: 0

**Tesis doctorals (totes amb menció europea)**

Autor: Iñigo Etayo Labiano. Any: 2018

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

Directors: Rafael Franco & Gemma Navarro

Autora: Irene Reyes Resina. Any: 2018

Títol: *GPR55, CB1 and CB2 receptor heteromers. From cell signalling to pharmacology.*

Directors: Rafael Franco & Gemma Navarro

Autor: Edgar Angelats Canals. Any: 2018

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

Directors: Gemma Navarro & Rafael Franco