

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**EFFECTOS ADAPTATIVOS DE LA TRANSDUCCIÓN
ASOCIADA AL RECEPTOR OPIOIDE MU EN LOS
PROCESOS DE EXPOSICIÓN AGUDA Y CRÓNICA A
LOS OPIOIDES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Marta Rodríguez Díaz

Bajo la dirección del Doctor:

Javier Garzón Niño

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2039-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



Efectos adaptativos de la transducción asociada al receptor opioide mu en los procesos de exposición aguda y crónica a los opioides.

Marta Rodríguez Díaz
Madrid, Noviembre de 2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

*Efectos adaptativos de la transducción asociada al
receptor opioide mu en los procesos de exposición aguda y
crónica a los opioides.*

Vº Bº Director

Ponente

Fdo. Dr. Javier Garzón

Fdo. Dña. Marta Rodríguez

D. JAVIER GARZÓN NIÑO, INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL C.S.I.C. Y JEFE DEL LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGÍA DEL INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado “EFECTOS ADAPTATIVOS DE LA TRANSDUCCIÓN ASOCIADA AL RECEPTOR OPIOIDE MU EN LOS PROCESOS DE EXPOSICIÓN AGUDA Y CRÓNICA A LOS OPIOIDES” ha sido realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología de este Instituto bajo mi dirección, por Dña. Marta Rodríguez Díaz para optar al grado de Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste donde proceda se firma este certificado en Madrid a 23 de Noviembre de 2001.

Fdo.: Dr. Colabo Garzón Niño

Deseo agradecer al Dr. Rolando Garzón y a la Dra. Pilar Rolando-Blázquez la colaboración brindada para realizar este trabajo de colaboración, así como su dirección y ayuda en la colaboración del mismo, y a la Dra. Juana Benedí Gonzalez por su colaboración al actuar como tutora ante el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la U.C.M.

A Luis y a mi familia

INDICE

I. Introducción	1
1.- Sistema opioide	7
2.- Receptores opioides	8
2.1.- Clonación de los receptores opioides	10
3.- Acoplamiento de los receptores opioides a proteínas G hetero-triméricas	14
3.1.- Subunidades que integran la proteína G	16
3.1.1.- Subunidad α	16
3.1.2.- Subunidades $\beta\gamma$	20
3.2.- Moduladores de la función de la proteína G	22
3.2.1.- RGS (Regulators of G-protein signaling)	22
3.2.2.- Fosducina y proteínas tipo fosducina	27
4.- Efectores y respuesta celular	30
4.1. Canales iónicos	31
4.1.1.- Canales de Ca^{2+}	31
4.1.2.- Canales de K^{+}	33
4.1.3.- Otros canales iónicos	35
4.2.- Adenilato ciclasa	36
4.3.- Fosfolipasa C	39
4.3.1.- Inositol trifosfato y movilización de Ca^{2+}	41
4.3.2.- Diacilglicerol y activación de PKC y quinasas dependientes de Ca^{2+}	42
4.4.- Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)	45
5.- Mecanismos de regulación del receptor opioide	49
5.1.- Fosforilación del receptor y desensibilización	49
5.2.- Internalización del receptor opioide	51
6.- Antecedentes y objetivos del estudio	53
II Materiales y Métodos	59
1.- Materiales	61
1.1.- Animales	61
1.2.- Cultivos celulares	61
1.3.- Anticuerpos y proteínas recombinantes empleados en este estudio	62
1.4.- Obtención y caracterización de anticuerpos anti-Phd/PhLP _L	63
1.4.1.- Acoplamiento del péptido antigénico al toxoide diftérico	63
1.4.2.- Inmunización de los animales	63
1.4.3.- Obtención y preservación del suero	64
1.4.4.- Caracterización y titulación de los sueros	64
1.4.5.- Purificación de la IgG específica	65
1.4.6.- Caracterización y titulación de la IgG	66
1.5.- Purificación de PhLP _L a partir de cerebro de ratón	66
1.5.1.- Cromatografía de afinidad en columna de germen de trigo	67
1.5.2.- Cromatografía de afinidad mediante anticuerpo acoplado a agarosa	68
1.6.- Obtención de proteínas recombinantes	69
1.6.1.- Clonaje	69
• La preparación del inserto	69

• La preparación del vector.....	71
• Ligación.....	71
1.6.2.- Expresión.....	71
1.6.3.- Purificación.....	73
1.6.3.1.- Purificación de la proteína de fusión GST-PhLP _L	73
• Digestión de GST-PhLP _L con trombina.....	73
1.6.3.2.- Purificación de la proteína de fusión 6XHis-Gα _{i2}	74
1.7.- Marcaje con fluorescencia de proteínas Gα _{i2} recombinantes.....	75
1.8. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido.....	75
2.- Métodos.....	79
2.1.- Administración intracerebroventricular.....	79
2.1.1.- Administración i.c.v. de oligodeoxinucleótidos antisentido.....	79
2.1.2.- Administración i.c.v. de Gα _{i2} -miristoiladas.....	80
2.2.- Administración de Gα _{i2} -miristoiladas a cultivos de astrocitos.....	80
2.3.- Medida del efecto analgésico evocado por diversos agonistas.....	81
2.4.- Inducción de la tolerancia y la dependencia a morfina.....	82
2.4.1.- Administración crónica de morfina y desarrollo de tolerancia.....	82
2.4.2.- Administración de naloxona y desarrollo de la dependencia física.....	83
2.5.- Radioinmunoensayo (RIA).....	84
2.5.1.- Determinación de los niveles de morfina en suero.....	84
2.5.2.- Determinación de los niveles de morfina en cerebro.....	85
2.6.- Preparación de los distintos componentes celulares para su análisis.....	86
2.6.1.- Fraccionamiento de las estructuras del S.N.C. de ratón.....	86
2.6.2.- Obtención de las caveolas a partir de cultivos de astrocitos.....	87
2.7.- Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (Western blotting).....	88
2.7.1.- Preparación de las muestras para SDS/PAGE.....	88
2.7.2.- Electroforesis SDS-PAGE.....	89
2.7.3.- Transferencia de proteínas a soporte sólido: detección inmunológica (<i>Western blotting</i>).....	90
• Bloqueo de la membrana.....	91
• Incubación del anticuerpo primario con la proteína de interés.....	91
• Detección y revelado.....	91
2.8.- Isoelectroenfoque.....	92
2.9.- Ensayo de fosforilación de la PhLP _L	93
2.9.1.- Fosforilación por PKAc.....	93
2.10.- Deglicosilación de la PhLP _L	93
2.11.- Estudios de inmunoprecipitación.....	94
2.12.- Determinación de la actividad GTPásica de las Gα _{i2} -miristoiladas administradas in vivo a ratones <i>knock-down</i>	95
2.13.- Ensayos de unión de radioligandos.....	96
2.14.- Microscopía electrónica.....	97
2.14.1.- Fijación.....	97
2.14.2.- Deshidratación e inclusión.....	98
2.14.3.- Cortes semifinos, ultrafinos.....	99
2.14.4.- Tinción y observación al microscopio electrónico.....	99
2.15.- Microscopía confocal.....	100

III. Resultados	101
1.- Desarrollo de la tolerancia y dependencia a la morfina crónica.	103
2.- Efecto de la administración crónica de opioides sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratón.	107
2.1.- Efecto del tratamiento crónico de morfina sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratón.	108
2.2.- Efecto del tratamiento crónico de deltorfina II sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratones <i>knock-out</i> del receptor opioide mu.	111
3.- Estudio de las proteínas moduladoras de la función de las proteínas G.	114
3.1.- Estudio de las proteínas RGS (Regulator of G-protein Signaling) en el S.N.C. de ratón.	114
3.1.1.- Implicación de las RGS en la analgesia inducida por morfina.	114
3.1.2.- Presencia y distribución de RGS2 y RGS9-2 en diferentes áreas del S.N.C. de ratón. Eficacia y selectividad de los ODNs.	118
3.1.3.- Efecto de la RGS2 y RGS9-2 en la tolerancia aguda inducida por morfina.	120
3.1.4.- Efecto de la RGS2 y RGS9-2 en la tolerancia crónica a morfina.	123
3.2.- Presencia y distribución de Gβ ₅ en diferentes áreas del S.N.C. de ratón. Eficacia y selectividad del ODN-β ₅ ²⁹³⁻³⁰⁹ .	125
3.2.1.- Implicación de Gβ ₅ en la analgesia inducida por morfina.	126
3.2.2.- Efecto de Gβ ₅ en la tolerancia aguda inducida por morfina.	127
3.3.- Estudio de las proteínas tipo fosducina en el S.N.C. de ratón.	128
3.3.1.- Caracterización de PhLP _L en S.N.C. de rata y ratón.	129
3.3.1.1.- Distribución subcelular de inmunorreactividad tipo PhLP _L .	129
3.3.1.2.- Caracterización por peso molecular.	131
3.3.1.3.- Caracterización por punto isoeléctrico.	134
3.3.1.4.- Caracterización de las modificaciones post-traduccionales de la PhLP _L .	135
3.3.1.4.1.- Deglicosilación de la PhLP _L .	135
3.3.1.4.2.- Fosforilación de la PhLP _L .	136
3.3.2.- Distribución y cuantificación de la PhLP _L en el S.N.C. de ratón.	137
3.3.3.- Estudio de los mecanismos de regulación de la función de la PhLP _L .	139
3.3.4.- Estudios comportamentales.	140
3.3.4.1.- Implicación de la PhLP _L en la analgesia inducida por agonistas opioides y no opioides.	140
3.3.4.2.- Efecto de la PhLP _L en la tolerancia aguda inducida por morfina.	143
3.3.4.3.- Efecto de la administración in vivo de subunidades Gα ₁₂ -miristoiladas en la tolerancia aguda evocada por morfina.	145
3.3.4.4.- Efecto de la PhLP _L en la tolerancia crónica a morfina.	148
3.3.4.5.- Efecto del ODN-PhLP _L administrado in vivo, sobre la unión específica de la [¹²⁵ I]-Tyr ²⁷ β _h -endorfina-(1-31) a membranas P ₂ de SGPA de ratones <i>knock-down</i> .	148

4.- Estudio de la internalización e incorporación funcional a la regulación de receptores de proteínas $G\alpha_{i2}$-miristoiladas-exógenas.	152
4.1.- Efecto de subunidades $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-exógenas sobre la actividad GTPásica estimulada por el receptor.	153
4.2.- Caracterización del mecanismo de entrada de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas en las células del SNC.	156
4.2.1.- Implicación de las caveolas en la internalización de las $G\alpha_{i2}$ exógenas.	156
4.2.2.- Saturabilidad del mecanismo de entrada de las $G\alpha_{i2}$ exógenas.	158
 IV. <i>Discusión</i>	161
1.- Participación de las proteína quinasas C en los procesos de desensibilización del receptor opioide.	164
2.- Participación de las subunidades $G\alpha$ en los procesos de desensibilización del receptor opioide.	171
3.- Participación de los reguladores fisiológicos de la función de las proteínas G en la desensibilización del receptor opioide.	177
3.1.- Participación de las proteínas RGS en los procesos de desensibilización del receptor opioide.	177
3.2.- Participación de las proteínas tipo fosducina en la desensibilización del receptor opioide.	182
4.- Importancia de las proteínas G y sus reguladores en la respuesta fisiológica del receptor opioide.	189
 V. <i>Conclusiones</i>	193
VI. <i>Bibliografía</i>	199

ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc: adenosina fosfato 3'-5'-cíclico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BME/F-10S: Medio basal+10% suero fetal de ternera
BME: Medio basal (de *Basal Medium Eagle*)
CAMK: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina
CTX: toxina colérica
DAG: diacilglicerol
[D-Ala²]deltorfina II: Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂
DAMGO: Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-NH(CH₂)₂-OH
DPDPE: Tyr-[D-Pen-Gly-Phe-D-Pen]
DTT: 1,4-ditiotreitol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético
GAP: proteína activadora de GTPasa (de *G activating protein*)
GDP: guanosina 5'-difosfato
GPCR: receptores acoplados a proteínas G (de *G protein coupled receptor*)
GRK: proteína quinasa de receptores G (de *G protein receptor kinase*)
GTP: guanosina 5'-trifosfato
i.c.v.: intracerebroventricular
i.p.: intraperitoneal
ICI-174864: N,N-dialil-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu
IgG: inmunoglobulina G
IP₃: inositol trifosfato
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (de *Mitogen-activated protein kinase*)
MEP: máximo efecto posible
ODN: oligodeoxinucleótido antisentido
PDE: fosfodiesterasa
Phd: fosducina
PhLP: proteínas tipo fosducina
PKA: proteína quinasa AMPc-dependiente
PKC: proteína quinasa C
PLC: fosfolipasa C
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTX: toxina pertúsica
PVDF: difluoruro de polivinilideno
RACK: receptores de la proteína quinasa C activa (de *Receptor active C-kinase*)
RGS: proteínas reguladoras de la actividad de las proteínas G (de *Regulators of G-protein signalling*)
S.G.P.A.: sustancia gris periacueductal
S.N.C.: Sistema Nervioso Central
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS/PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Introducción

La transmisión intercelular de señales es esencial para el correcto funcionamiento de un ser vivo. Este proceso se consigue principalmente a través de agentes químicos muy específicos, que actúan sobre proteínas con alta capacidad de discriminación, denominadas receptores, que se orientan hacia la parte externa de la membrana. Desde un punto de vista fisiológico, los receptores son moléculas de la célula a las que se unen de forma específica los neurotransmisores, mediadores u hormonas, generándose a partir de esta unión una respuesta funcional. De esta manera, regulan una ruta de transmisión que, en última instancia, incide en procesos celulares como la secreción, la contracción, el metabolismo o el crecimiento.

En el sistema nervioso existe una gran diversidad de receptores, no obstante, la forma en la que procesan las señales extracelulares es uniforme. La información se internaliza en la célula mediante la modulación del tránsito iónico, y/o de la producción de segundos mensajeros intracelulares, que son moléculas de pequeño tamaño, lo que permite que la señal se propague rápidamente por toda la célula.

Los receptores de membrana pueden clasificarse de acuerdo con los mecanismos implicados en la transmisión de la señal al interior celular. Según este criterio, se subdividen en *receptores de canal*, *receptores con actividad enzimática* y *receptores acoplados a proteínas G*. Los primeros son proteínas oligoméricas que forman un canal iónico cuya apertura es modulada por los agonistas, de modo que el efecto primario se manifiesta según un cambio en la polaridad de la membrana. A este grupo pertenecen cierto número de receptores de neurotransmisores, como el nicotínico de la acetilcolina, los ionotrópicos del glutamato o el receptor GABA_A. Los receptores con actividad enzimática son proteínas monoméricas u oligoméricas con un dominio intracelular responsable de dicha actividad, la cual se inicia tras la unión de los agonistas. Dentro de este grupo se conocen receptores con actividades guanilil ciclasa (como los de péptidos natriuréticos), tirosina quinasa (como los de insulina y factores de crecimiento) y fosfoproteína fosfatasa. Finalmente, el último grupo de receptores son proteínas monoméricas que, mediante la participación de proteínas reguladoras fijadoras de

nucleótidos de guanina, las proteínas G, regulan sistemas efectores, los cuales pueden ser canales iónicos o enzimas generadores de segundos mensajeros.

Hasta la fecha, se han descrito más de 2000 miembros de GPCR (*G protein coupled receptor*) agrupados en ~50 familias (ver por ej. *Attwood, 2001*), de los cuales más de 200 están identificados y son receptores para ligandos de naturaleza química extremadamente diversa, entre los que se encuentran aminoácidos, aminos, péptidos, y un gran número de señales sensoriales. Además constituyen el lugar de acción de numerosos agentes farmacológicamente activos, entre ellos los opioides endógenos y los alcaloides tipo morfina derivados del opio.

Estos receptores comparten un mismo modelo estructural (siete dominios transmembranales), y su amplia participación en procesos fisiológicos evidencia el interés del estudio de sus mecanismos de activación y desactivación. Una característica general de estos receptores es que muestran mecanismos de regulación complejos, que modulan su capacidad de respuesta y desempeñan un papel esencial en la integración de señales en el ámbito celular y en procesos de desensibilización o tolerancia, que pueden afectar a su expresión, funcionalidad y localización subcelular.

En un principio se pensaba que estos mecanismos de regulación actuaban a nivel de receptor e implicaban su fosforilación por una familia de quinasas específicas, denominadas GRKs (*G protein coupled receptor kinases*). El receptor así fosforilado interacciona con proteínas adaptadoras denominadas arrestinas, lo que bloquea la transducción de la señal, y facilita la internalización del receptor a través de vesículas recubiertas de clatrina. Actualmente, se ha ampliado la idea de regulación a nivel de las proteínas transductoras G, así como de proteínas que modulan la función de las proteínas G, como las de tipo fosducina, que condicionan la capacidad de las subunidades $\beta\gamma$ para unirse a las subunidades $G\alpha$ y también a ciertos efectores, o las RGS (*Regulator of G-protein Signaling*) que regulan la función de $G\alpha$ por activación de la GTPasa intrínseca de estas subunidades. Todas estas proteínas reguladoras desempeñan un papel clave en la modulación de los GPCRs, por lo que los cambios que

alteren su expresión o función también afectan a la eficacia de la señalización intercelular y pueden incluso tener consecuencias fisiopatológicas.

A la vista de estas consideraciones, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de los procesos adaptativos neurales responsables de la taquifilaxia y la tolerancia/dependencia. Se ha utilizado como modelo el receptor opioide μ y su transducción asociada, a fin de caracterizar la génesis de los efectos secundarios asociados a la actuación aguda y crónica de diversos agentes moduladores de su función.

La investigación realizada podría ser útil al diseño de nuevas herramientas orientadas a retrasar la aparición de tolerancia a los opioides. En este sentido, datos previos a este estudio, obtenidos en nuestro Laboratorio han demostrado que la taquifilaxia opioide (tolerancia aguda) se revierte por la captación selectiva e incorporación funcional de subunidades $G\alpha$ recombinantes desde el líquido cefalorraquídeo hacia el interior de las células neurales (*Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001*). Se puede afirmar que se presentan interesantes perspectivas que trascienden el ámbito del sistema opioide para hacerse comunes a una variedad de receptores acoplados a proteínas G.

1.- Sistema opioide.

La demostración de la existencia en el S.N.C. del receptor opioide μ impulsó, a mediados de la década de los setenta (*Goldstein y col., 1971*), a la identificación de los opioides endógenos que se agruparon en tres familias: encefalinas, endorfinas, y dinorfinas en base a la proteína precursora de la que derivan (proencefalina, proopiomelanocortina, y prodinorfina, respectivamente) (*Lord y col., 1977; Höllt, 1983*).

Estos reguladores fisiológicos muestran afinidades diferentes por los distintos receptores opioides, así como una distribución anatómica característica en el S.N.C. (*Höllt, 1983; Khachaturian y col., 1985*). En función de su selectividad por los distintos receptores se ha descrito que las encefalinas son los ligandos endógenos del δ , y la dinorfina A (1-17) del κ (*Chang y col., 1981; Kosterlitz y col., 1982; Garzón y col., 1983*), mientras que la β -endorfina, a pesar de unirse a los receptores μ y δ con alta afinidad (*Chang y Chang, 1983*), se ha propuesto como ligando endógeno del receptor opioide ϵ (*Wuster y col., 1979; Chang y Cuatrecasas, 1981; Garzón y col., 1985*).

Recientemente, se han aislado del cerebro dos nuevos péptidos, la endomorfina-1 y la endomorfina-2, que se han clasificado dentro de una nueva familia (*Zadina y col., 1997*), y que al igual que la morfina presentan una gran afinidad y selectividad por el receptor μ , por lo que se han propuesto como sus ligandos endógenos. Algunos estudios demuestran que la endomorfina-1 y 2 compiten por el receptor opioide μ (*Goldberg y col., 1998; Sánchez-Blázquez y col., 1999, 1999*), y no presentan afinidad por los δ o κ . Además, estos péptidos se localizan en regiones del cerebro y la médula espinal que son ricas en receptores μ (*Martín-Schild y col., 1997, 1998, 1999; Zadina y col., 1997; Pierce y col., 1998; Schreff y col., 1998*), y sus efectos son antagonizados con naloxona y β -funaltrexamina (*Stone y col., 1997; Tseng y col., 2000*).

Del análisis de su estructura y de los perfiles de unión de los ligandos endógenos a los receptores opioides se conoce que la afinidad por el receptor δ depende sobre todo de la

presencia de la secuencia íntegra de la encefalina inicial; la pérdida de Tyr1 o alteraciones en su secuencia da lugar a pérdidas de afinidad. La afinidad por el receptor μ y, sobre todo, por la del κ se ve favorecida por la longitud del péptido. Se propone la existencia de un sitio secundario de unión aparte del utilizado por la encefalina para la selectividad μ o κ (Garzón y col., 1983).

Estos estudios inicialmente realizados sobre receptores del S.N.C. de roedores se han visto, posteriormente, confirmados con los receptores opioides clonados, esta vez expresados en células COS-1 (Mansour y col., 1995). Se indica que la secuencia de metionina-encefalina y leucina-encefalina es requisito indispensable para la selectividad μ o δ , mientras que partiendo de la secuencia de encefalina la unión al κ requiere de una cadena más larga con participación de Arg.

2.- Receptores opioides.

Los opioides ejercen sus efectos en el Sistema Nervioso a través de tres tipos de receptores de membrana μ , δ , y κ , que presentan diferentes perfiles farmacológicos así como distribución anatómica (Mansour y col., 1988). En el vaso deferente de la rata se ha identificado un cuarto tipo de receptor opioide especialmente sensible a la β -endorfina, el receptor ϵ (Wüster y col., 1979; Garzón y col., 1985). Estos receptores y sus ligandos endógenos integran vías moduladoras inhibitorias ampliamente distribuidas, que actúan en general sobre diversos sistemas de neurotransmisores disminuyendo la descarga neuronal. Su papel es clave en el control de la información dolorosa (Dickenson, 1991) y en circuitos de refuerzo (Di Chiara y North, 1992). Además, los opioides poseen otras acciones centrales y periféricas a nivel cardiovascular, respiratorio, neuroendocrino, sobre el sistema inmune o sobre la actividad motora.

Los receptores μ , δ , y κ han sido identificados por la distinta selectividad de sus ligandos (Goldstein y col., 1971). Además, estudios farmacológicos clásicos han sugerido la existencia de subtipos para cada uno de estos receptores. En este sentido, Pasternak y Snyder (1975) describieron dos subpoblaciones para el receptor opioide tipo μ , preferentes para compuestos como la morfina, las cuales denominaron μ_1 y μ_2 . El

receptor μ_1 parece ser el principal responsable de la analgesia opioide supraespinal, mientras que el tipo μ_2 , estaría relacionado con otros efectos opioides como son la depresión respiratoria, la constipación y la dependencia física.

Los resultados obtenidos en una cepa de ratones mutantes a los que se les ha eliminado el gen del receptor opioide μ , confirman que es el mismo receptor el que da origen a la analgesia y a los efectos adictivos de la morfina (Matthes y col., 1996) (Tabla 1). Por tanto, este receptor se presenta como el punto crucial para producir la deseada antinocicepción opioide, así como el lugar donde actuar para contrarrestar la génesis de la tolerancia y dependencia.

Tabla1. Respuesta a los opioides de los ratones carentes del receptor μ (MOR-/-), δ (DOR-/-) o κ (KOR-/-).					
<i>Opioide</i>	<i>Respuesta en ratones wild-type (+/+)</i>	<i>MOR-/-</i>	<i>Ref.</i>	DO R-/- (Ref. 1)	KO R-/- (Ref. 2)
Morfina (μ)	Analgesia espinal	No	Loh y col. (1998)	Si	Si
	Analgesia supraespinal	No	Loh y col. (1998)	-	-
	Síndrome de abstinencia	No	Matthes y col. (1996)	-	↓
	Depresión respiratoria	No	Matthes y col. (1998)	-	-
	Inhibición del tránsito GI	No	Roy y col. (1998)	-	-
	Inmunosupresión	No	Gavériaux-Ruff (1998)	-	-
	Hiperlocomoción	No	Tian y col. (1996)	-	-
Endomorfina2 (μ)	Analgesia espinal	No	Loh y col. (1998)	-	-
	Analgesia supraespinal	No	Loh y col. (1998)	-	-
DPDPE (δ)	Analgesia espinal	↓ ó Si	Matthes y col. (1998) Loh y col. (1998)	No -	- -
	Analgesia supraespinal	↓ ó Si	Matthes y col. (1998) Loh y col. (1998)	- -	- -
Deltorfina II (δ)	Analgesia espinal	↓	Matthes y col. (1998)	-	-
	Analgesia supraespinal	Si	Matthes y col. (1998)	-	-
U50488H (κ)	Analgesia espinal	Si	Matthes y col. (1998)	-	No
	Analgesia supraespinal	Si	Matthes y col. (1998)	-	No
	Hipolocomoción	-	-	-	↓
	Disforia	-	-	-	↓

DPDPE: [D-Pen², D-Pen⁵] encefalina; GI: gastrotestinal
 Ref. 1: Zhu y col., (1997)
 Ref. 2: Simonin y col., (1998)

Los receptores tipo κ se han subclasificado en tres subtipos en base a estudios de fijación de ligandos: κ_1 , κ_2 y κ_3 (Zukin y col., 1988). Los κ_1 fijan preferentemente ketociclazocinas, que presentan baja afinidad por los κ_2 y los κ_3 que, en condiciones

muy restrictivas para la fijación al receptor opioide tipo κ son marcados selectivamente por la naloxona y benzoilhidrazona (Yasuda y col., 1993).

De forma análoga, se ha establecido la existencia de subtipos farmacológicos para el receptor opioide delta, a los cuales se ha denominado δ_1 y δ_2 (Sofuoglu y col., 1991; Jiang y col., 1991). El subtipo δ_1 tiene como agonista específico al péptido DPDPE mientras que la [D-Ala²] deltorfina II sería el agonista preferencial del δ_2 . Ambos receptores participarían en la mediación de los efectos antinociceptivos a nivel supraespinal en el ratón, si bien el papel del subtipo δ_2 sería predominante en los efectos antinociceptivos espinales.

2.1.- Clonación de los receptores opioides.

El primer receptor opioide clonado fue el receptor tipo δ de ratón. Casi simultáneamente dos grupos (Evans y col., 1992; Kieffer y col., 1992) identificaron este receptor utilizando distintos procedimientos, por expresión y clonaje usando las librerías de ADNc derivadas de la línea celular NG 108-15. La disponibilidad de estas células fue importante porque expresan los receptores δ en mayor cantidad (acerca de 400 fmol/mg de proteína) que en tejido nervioso. La transfección de fracciones individuales de esta librería de ADN en células COS permitió la identificación con análogos radiactivos de las encefalinas de clones que expresaban este receptor.

Además, aprovechando la observación de la gran homología entre los receptores opioides, varios grupos, describieron los ADNc de los receptores μ (MOR), δ (DOR) y κ (KOR) de varias especies animales (Evans y col., 1992; Chen y col., 1993; Yasuda y col., 1993) y del humano (Wang y col., 1994; Knapp y col., 1994; Mansson y col., 1994). Esto fue posible por el alto grado de similitud de la secuencia aminoacídica que presentan los tres receptores opioides, con una identidad aproximada del 65%, localizada principalmente en las regiones que atraviesan la membrana y en los bucles intracelulares. Las regiones que más divergen son los extremos amino y carboxilo terminales. Los tres tipos de receptores tienen la secuencia aspartato-arginina-tirosina y

aspartatos en el segundo y tercer dominio transmembranal, las cuales son conservadas en los receptores acoplados a proteínas G.

Debido a que los receptores humanos son el centro de la terapéutica de drogas opiáceas es particularmente importante obtener los genes para cada tipo de receptor opioide. Se ha descrito la existencia de tres genes que codifican proteínas de 398, 372 y 380 aminoácidos que corresponden a los receptores μ , δ y κ : un único gen para el receptor μ se localiza en el cromosoma 6 zona q24-25 humano, el δ también existe como única copia en el cromosoma 1 región p34.3-36.1 humano (*Zaki y col., 1996*) y el correspondiente al κ se ha descrito en el cromosoma 8 región q11-12 (*Simonin y col., 1995*).

Dada la exclusividad de estos genes se buscan posibles lecturas alternativas que pudieran originar los subtipos farmacológicos descritos. En este sentido, el análisis de los genes del MOR, DOR, y KOR revela intrones y exones en la región que codifica la proteína (*Kieffer 1995*). En todos los genes de los receptores opioides, los intrones han sido localizados después de la región que codifica el primer y cuarto dominio transmembranal.

El gen que codifica el MOR presenta un intrón adicional después del C-terminal (*Bare y col., 1994; Min y col., 1994*), y han sido detectadas dos variantes del receptor μ (MOR1, MOR1B), que parecen ser lecturas alternativas del mismo gen, porque ambos clones han sido aislados por expresión y clonaje de librerías de ADNc (*Wang y col., 1993; Chen y col., 1993; Zimprich y col., 1995*). Por otro lado, este gen presenta un exon adicional que codifica el extremo C-terminal del MOR1B (*Pan y col., 1999*) y se ha descrito la presencia de dos variantes del receptor opioide μ en el cerebro humano que presentan distintos C-terminales (*Bare y col., 1994*), ya que anticuerpos policlonales dirigidos a péptidos de los extremos C-terminales de MOR1 o MOR1B, muestran diferentes patrones de expresión (*Schulz y col., 1995*).

También se ha descrito otra variante (MOR1A), que es 8 aminoácidos más corta que MOR1, ya que el intrón 3' en el tercer exón que codifica la proteína no ha sido

eliminado. Esta nueva variante no parece corresponder con los receptores descritos. Recientemente Pan y colaboradores (1999, 2000) han identificado 4 nuevos exones, que por combinación con los ya descritos, generan 4 variantes del receptor que derivan de lecturas alternativas del mismo gen: MOR1C, MOR1D, MOR1E y MOR1F.

Evidencias, fundamentalmente, farmacológicas sugieren que los receptores opioides μ , δ y κ clonados corresponden a los subtipos μ_1 , δ_2 y κ_1 (Lai y col., 1994; Raynor y col., 1994; Uhl y col., 1994; Yasuda y col., 1994). Los estudios realizados sobre estos receptores revelan que los compuestos con capacidad altamente adictiva tales como morfina, fentanilo y metadona, presentan una alta afinidad por el receptor μ clonado pero muy poca por los receptores δ o κ (Raynor y col., 1994).

Es posible que algunos subtipos farmacológicos tengan su base en modificaciones postraduccionales de los receptores, por ejemplo, el receptor μ posee 5 lugares posibles de glicosilación en el terminal amino, y dos se han descrito para el δ y el κ . Sin embargo, mutaciones que suprimen las glicosilaciones no alteran la farmacología de los receptores (Wang y col., 1993; Surrat y col., 1994). Por el contrario, otras modificaciones, tales como palmitoilación y fosforilación modifican los perfiles de unión de los ligandos (Mouillac y col., 1992).

Además, estudios bioquímicos, biofísicos y funcionales, han demostrado la existencia de dímeros y/o oligómeros funcionales de los GPCRs (Hebert y Bouvier, 1998; Rocheville y col., 2000; Gines y col., 2000). Así, por ejemplo, se ha descrito que la dimerización de los receptores B del ácido γ -aminobutírico (GABA) R1a y R2, es necesaria para la transmisión de la señal al interior de la célula, en cultivos celulares y en neuronas del ganglio superior de rata (Jones y col., 1998; Kaupmann y col., 1998; White y col., 1998; Kuner y col., 1999; Marshall y col., 1999; Sullivan y col., 2000); por otro lado, la dimerización de los receptores β_2 adrenérgicos favorece la eficiencia del acoplamiento del receptor con la proteína G (Hebert y col., 1996, 1998; Angers y col., 2000), mientras que, la asociación de los receptores opioides o receptores 1 y 5 de somatostatina, resulta en heterodímeros con propiedades funcionales únicas (Jordan y Devi, 1999; George y col., 2000; Gomes y col., 2000; Rocheville y col., 2000).

En este sentido, algunos receptores δ forman complejos con el receptor μ . Schoffelmeer y colaboradores (1990) mediante experimentos de unión irreversible (*cross-linking*) han descrito su existencia en estructuras del S.N.C., diferenciándose receptores $\delta_{\text{noncomplexed}}$ y $\delta_{\text{complexed}}$, según se trate de receptores independientes o formando complejos con el receptor μ , respectivamente (Xu y col., 1993; Cha y col., 1995). Además, agonistas δ a concentraciones subefectivas (no capaces de desencadenar respuestas δ directas) modulan la antinocicepción μ (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1989; Porreca y col., 1992; Suzuki et al, 1996).

La obtención de ratones modificados genéticamente, que carecen del receptor μ (*knock-out*) proporciona una herramienta genética para determinar la posible interacción de los receptores μ y δ (Tabla 1). Los estudios llevados al respecto muestran que la analgesia espinal producida por los agonistas δ , DPDPE y deltorfina II, aunque se mantiene en estos animales con respecto a los *wild-type* (que expresan el genotipo salvaje, y por tanto el receptor μ) (Loh y col., 1998), esta disminuye en mayor o menor grado (Sora y col., 1997; Matthes y col., 1998), lo que sugiere que la presencia del receptor μ es fundamental para obtener una respuesta analgésica completa de ciertos agonistas δ .

En cuanto a posibles interacciones entre los receptores μ y κ , para producir la antinocicepción, hay pocas evidencias farmacológicas (Rothman y col, 1993) o genéticas (Matthes y col., 1998) y mientras que la interacción física entre ambos receptores no ha podido ser demostrada, se ha descrito que el receptor opioide κ forma dímeros selectivos con los receptores δ (Jordan y Devi, 1999).

Por último, otra explicación de la existencia de los subtipos de receptores opioides, es la interacción específica entre el receptor y el efector. El hecho de que los GPCR puedan acoplarse con diversos tipos de proteínas G abre la posibilidad a la conducción de señales por parte de los agonistas (Garzón y col., 1994), de forma que diferentes agonistas puedan dirigir a un receptor hacia la activación de unos tipos u otros de proteínas G.

Así, una consecuencia del acoplamiento específico receptor-proteína G/agonista, es el hecho de que un mismo receptor puede mostrar un perfil farmacológico diferente según la ruta de segundos mensajeros que es considerada para estudiar el orden de eficacias de diversos agonistas (*Spengler y col., 1993; Robb y col., 1994*), lo que puede ser interpretado como posibles subtipos farmacológicos de un receptor.

3.- Acoplamiento de los receptores opioides a proteínas G hetero-triméricas.

Los GPCRs se acoplan, a través de las proteínas G, a varios enzimas intracelulares, canales iónicos y transportadores (*Birnbaumer y col., 1990*). Estas proteínas son heterotrímeros de subunidades denominadas α , β y γ . En reposo, las proteínas G se encuentran acopladas a receptores no activados por agonistas y la subunidad $G\alpha$ porta una molécula de GDP.

Tras, la unión del agonista al receptor, la subunidad $G\alpha$, que posee actividad GTPásica, libera GDP y une GTP, en presencia de Mg^{2+} , lo que origina su disociación del dímero $G\beta\gamma$ y la regulación, por parte de la $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$, de uno o más de los enzimas transductores de señal y canales iónicos. La $G\alpha$ -GTP, al metabolizar el GTP en GDP, cesa la activación del efector correspondiente, volviendo a agruparse con las $G\beta\gamma$ para constituir la proteína G capaz de acoplarse en un nuevo ciclo al receptor (Figura 1).

Las proteínas G son piezas claves para la duración y amplificación de la señal, pues presentan cinéticas de inactivación particulares y su actividad puede ser regulada por otras proteínas, como las RGS (*Regulator of G-protein Signaling*) que constituyen una familia de gran diversidad funcional, ligadas directamente a la inactivación de las subunidades $G\alpha$, al acelerar la función GTPásica de estas proteínas (*Gold y col., 1997; Hepler y col., 1999*). En otros casos, la regulación es a nivel de los dímeros $G\beta\gamma$ (calmodulina, fosducina, proteínas tipo fosducina) (*Katada y col., 1987; Müller y col., 1996; Schulz y col., 1997*).

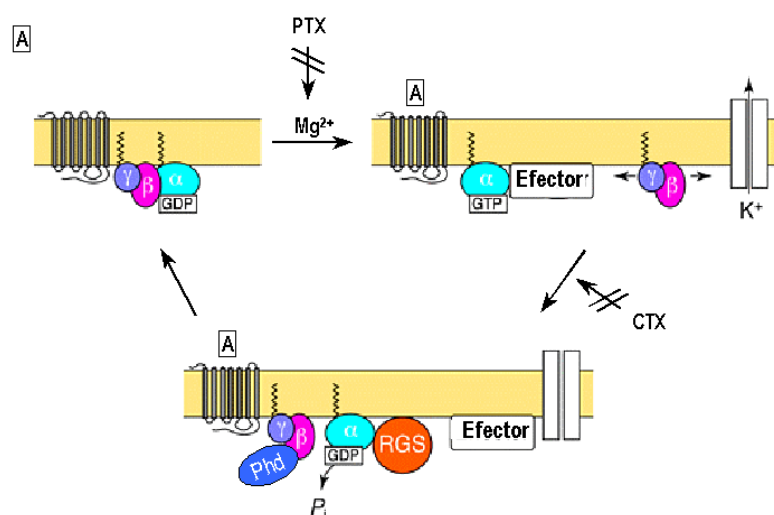


Figura 1. Ciclo de activación/desactivación de las proteínas G. Phd: fosducina; RGS: proteínas reguladoras de la función de la proteína G. PTX: toxina pertúsica; CTX: toxina colérica.

Se ha logrado establecer la correspondencia precisa entre diferentes receptores opioides y aquellas clases de proteínas G que son reguladas en la producción de la analgesia opioide. Así, el receptor μ regula $G_{\alpha/\beta} \geq G_{i2} > G_{i3} >> G_q$; el δ activa $G_{i2} = G_{i3} > G_{o2} = G_{i1}$, si se admiten los subtipos del δ , aparte de las proteínas G indicadas, el δ_1 regula a la G_{o1} y el δ_2 a la G_q (Garzón y col., 1998).

Las proteínas G se han clasificado en cuatro grupos (Tabla 2) atendiendo a las homologías de secuencia de una de sus subunidades (α), de las cuales se han descrito 21 diferentes, si bien la diversidad de las otras dos subunidades que las componen (β , 5 variantes; γ 12 variantes) determina el número de proteínas G, pues interactúan de forma restringida (Katz y Simon, 1995; Lee, C. y col., 1995). El número de sistemas efectores que regulan es más reducido e incluye canales de K^+ y de Ca^{2+} , así como diversos enzimas: la adenilato ciclasa, la fosfodiesterasa de GMP cíclico, la fosfolipasa C de fosfoinosítidos y las fosfolipasas A_2 y D. Estos efectores generan un número limitado de segundos mensajeros, como AMP cíclico, inositol trifosfato, diacilglicerol o Ca^{2+} , los cuales regulan actividades celulares a través de la modulación de algunas proteínas quinasas.

3.1.- Subunidades que integran la proteína G.

3.1.1.- Subunidad α .

Las subunidades α de las proteínas G se agrupan en cuatro clases atendiendo a la similitud de sus secuencias aminoacídicas (Tabla 2), que varían entre el 56 y el 95% de identidad, α_s , α_i , α_q y α_{12} (Neer, 1995). En mamíferos, se han clonado, al menos, 21 subunidades $G\alpha$ distintas, que provienen de la expresión de 17 genes, en algunos casos por lecturas alternativas (Jones y Reed, 1987; Matsuoka y col., 1988; Wickman y Clapham, 1995; Hurowitz y col., 2000).

Tabla 2. Clases de proteína G, distribución y efectores que regulan (adaptado de Neer, 1995).

Clase/ Subunidad	Toxina	Distribución en tejidos	Efactor
G_s $\alpha_{s(s)}$ $\alpha_{s(l)}$ α_{olf}	CTX	Ubícua	\uparrow AC
	CTX	Ubícua	\uparrow canales Ca^{2+} , \downarrow canales Na^+
	CTX	Neuroepitelio olfatorio	\uparrow AC
G_i α_{i1} α_{i2} α_{i3} α_{oA} α_{oB} α_{tr} α_{tc} α_{gust} $\alpha_{x/z}$	PTX	Ubícua	\downarrow canales K^+
	PTX	Ubícua	\downarrow canales Ca^{2+}
	PTX	Ubícua	\downarrow AC, \uparrow PLC
	PTX	Cerebro, otros	\uparrow PLA ₂
	PTX	Cerebro, otros	
	CTX, PTX	Retina (bastones)	
	CTX, PTX	Retina (conos)	\uparrow Fosfodiesterasa de GMPc
		Papilas gustativas	\downarrow AC
		Cerebro, plaquetas, adrenales	\downarrow AC
G_q α_q α_{11} α_{14} α_{15} α_{16}		Ubícua	\uparrow PLC β 1-3
		Ubícua	
		Pulmón, riñón, hígado	
		Células mieloides, células B	
		Células mieloides, Células T	\uparrow PLC β 1-3
G₁₂ α_{12} α_{13}		Ubícua	\uparrow Intercambio Na^+/K^+
		Ubícua	

CTX: toxina colérica
 PTX: toxina pertúsica
 AC: adenilato ciclasa
 PLC: fosfolipasa C.

Son proteínas de 39-52 kDa, en cuya estructura se distinguen dos dominios: un dominio Ras, común a todas las proteínas de la familia de las GTPasas, y un dominio llamado helicoidal por su estructura de hélice α , que no está presente en las proteínas G de bajo peso molecular (Figura 2). El primero contiene lugares implicados en la unión e hidrólisis de los nucleótidos de guanina, el sitio de unión para iones Mg^{2+} , el residuo Arg diana de la ADP-ribosilación por toxina colérica (CTX), así como sitios de interacción con dímeros $\beta\gamma$, receptores y efectores. En este dominio se distinguen 3 regiones *switch* adyacentes (residuos Ser173-Thr183, Phe195-Thr215 y Asp227-Arg238 en $G\alpha_t$), claves en los cambios conformacionales nucleótido-dependiente de la subunidad α durante el ciclo de activación-desactivación de la proteína G.

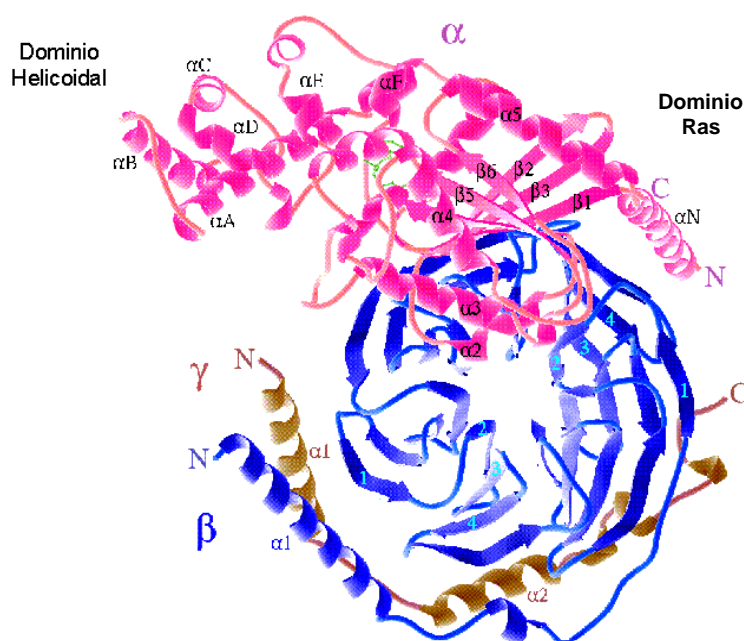


Figura 2. Estructura tridimensional del trímero $G\alpha\beta\gamma$. Se indican los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminales de cada una de las subunidades: α (representada en rosa), β (en azul) y γ (en marrón); así como los dominios helicoidal y Ras de la subunidad α .

Concretamente, algunos residuos de las regiones *switch* I y II, como Arg174 de α_t (178 en α_{i1}), diana de la ADP-ribosilación por CTX, o Gln200 de α_t (204 en α_{i1}), establecen interacciones fundamentales para la hidrólisis de GTP (Noel y col., 1993; Sondek y col., 1994; Coleman y col., 1994). Se especula que el dominio helicoidal

podría contener un residuo clave para la hidrólisis del GTP, o que también podría tener importancia en el sitio de unión con los efectores (*Rens-Domiano, 1995*).

El extremo amino terminal de la subunidad α participa en la unión con el complejo $\beta\gamma$ (Lambright y col., 1996). Por otra parte, dado que la ADP-ribosilación de las subunidades α bloquea la interacción de la proteína G con el receptor y que la presencia de anticuerpos específicos contra el extremo carboxilo terminal previene la activación de las proteínas G mediada por el receptor, se considera que el extremo carboxilo terminal está implicado en la interacción con el receptor (*Masters y col., 1998; Clapham y col., 1996*).

Las subunidades α pueden sufrir diferentes modificaciones covalentes de gran relevancia funcional (*Yamane y Fung, 1993*). Así, determinados subtipos de $G\alpha$ pueden ser ADP-ribosilados específicamente por toxinas bacterianas. La toxina colérica (producida por *Vibrio cholerae*) actúa sobre las subunidades α_s y α_{olf} , introduciendo un grupo ADP-ribosa en el residuo equivalente a Arg174 de α_t . Este residuo se encuentra inaccesible en las subunidades $G\alpha_t$ y $G\alpha_i$ formando parte del heterotrímero, por lo que estas $G\alpha$ sólo son sustrato de la CTX forzando condiciones que favorezcan su disociación del heterotrímero. El resultado de esta modificación es la activación constitutiva de la subunidad α (y, en consecuencia, de los dímeros $\beta\gamma$) al disminuir su actividad GTPásica intrínseca, lo que conduce finalmente a la activación o inhibición sostenida de efectores. La toxina pertúsica (de *Bordetella pertussis*) (PTX) ADP-ribosila las subunidades $G\alpha_t$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_i$ y $G\alpha_o$ en el residuo Cys4 a partir del extremo carboxilo-terminal. Otras subunidades α carecen de este residuo diana para la toxina. El sustrato preferente de esta toxina es la forma heterotrimérica de la proteína G, por lo que su actividad se potencia en presencia de dímeros $\beta\gamma$. Esta modificación conlleva el desacoplamiento entre receptor y proteína G.

Además, las subunidades α pueden sufrir modificaciones post-traduccionales de naturaleza lipídica, tales como las acilaciones (miristoilaciones o palmitoilaciones) (*Bigay y col., 1994; Wedegaertner y col., 1995*), importantes para la localización y funcionalidad de la subunidad, contribuyendo, junto con las interacciones α - $\beta\gamma$, a su anclaje a la

membrana (Milligan y col., 1995; Morris, 1995). También, pueden ser fosforiladas por la proteína quinasa C (PKC) (Fields y Casey, 1995; Kozasa y Gilman, 1996), lo que afecta a su interacción con el dímero $\beta\gamma$.

En este sentido, se ha descrito que determinados lípidos y proteínas se organizan en regiones concretas de la membrana celular, *rafts* o caveolas, que muestran unas características comunes, en cuanto al requerimiento de colesterol se refiere (Rothberg y col., 1990; Schnitzer y col., 1994; Murata y col., 1995; Monier y col., 1996; Schröder y col., 1998), su baja densidad y su resistencia a la solubilización en detergentes no iónicos (Gorodinsky y Harris, 1995; Schnitzer y col., 1995); y unas características morfológicas, bioquímicas y funcionales diferentes (Schnitzer y col., 1995; Liu y col., 1997).

Los *rafts* son dominios de la membrana plasmática, con una estructura en forma de balsa, ricos en una proteína denominada flotilina que funciona de modo estructural y sirve también de acoplamiento de otras proteínas de señalización. Asimismo, aquí se encuentran una serie de proteínas de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que participan en las interacciones lípido-lípido, importantes para la formación de los *rafts* y resistencia a detergentes no iónicos, que estos presentan, (Ahmed y col., 1997; Schröder y col., 1998; Brown y London, 2000; Garin y col., 2001). Los *rafts* se localizan en células sin caveolas, como las neuronas, (Fra y col., 1994; Gorodinsky y Harris, 1995; Bouillot y col., 1996), y en ellos se concentran numerosas moléculas de señalización, incrementando la eficiencia y especificidad de la señal de transducción al facilitar las interacciones apropiadas entre las proteínas. Por su parte, la caveolas son unas invaginaciones de la membrana plasmática (Schnitzer y col., 1995), con un papel importante en múltiples funciones celulares, entre las que se incluyen la transducción de señales, metabolismo lipídico, movimiento vesicular Golgi-membrana plasmática, crecimiento celular y apoptosis (Ikezu, y col., 1998), y dependen de la oligomerización de la caveolina para su formación (Fra y col., 1995; Monier y col., 1996; Lipardi y col., 1998). La caveolina está palmitoilada (Dietzen y col., 1995; Monier y col., 1996), y se liga directamente al colesterol, glicoesfingolípidos, y moléculas de señalización con ácidos grasos en su estructura, entre ellas las proteínas G heterotriméricas (Parton, 1994; Li y col., 1995, 1996; Monier y col., 1996; Song y col., 1996; Moffet y col., 2000).

La subunidad α de las proteína G se encuentra en altas cantidades en membranas caveolares de distintas fuentes (*Sargiacomo y col., 1993; Lisanti y col., 1994; Chang y col., 1994; Schnitzer y col., 1995; Li y col., 1995*). La caveolina interacciona directamente con múltiples subunidades α , incluyendo Gs, Go y Gi2, y pueden funcionalmente suprimir sus actividades basales por inhibir el intercambio de GDP-GTP (*Li y col., 1995; Okamoto y col., 1998*). Recientemente, se ha descrito que las proteínas G se dirigen a las caveolas y *rafts* de una forma diferencial, así, Gq se localizaría fundamentalmente en las caveolas, mientras que Gi y Gs residirían en los *rafts* (*Oh y Schnitzer, 2001*).

3.1.2.- Subunidades $\beta\gamma$.

Las subunidades $\beta\gamma$ forman un dímero que sólo puede disociarse en condiciones desnaturalizantes. Hasta ahora se han clonado 5 subunidades β en mamíferos, de peso molecular en torno a 36 kDa, que presentan una homología en su secuencia aminoacídica del 50-83% (*Watson y col., 1994*), así como 12 subunidades γ (*Morishita y col., 1995*), que presentan un peso molecular de 6-9 kDa y comparten menor homología (27-75%).

Por estudios cristalográficos se conoce la estructura tridimensional de dímeros $\beta\gamma$ libres (*Sondek y col., 1996* [$G\beta_1\gamma_1$]) y heterotrímeros $G\alpha\beta\gamma$ (*Wall y col., 1995* [$G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$]; *Lambright y col., 1996* [$G\alpha_s\beta_1\gamma_1$]). La subunidad β adopta una forma cilíndrica de hélice β integrada por siete palas (láminas β), que dejan en el centro de la hélice un poro (Figura 2). Esta estructura es reflejo de la cadena aminoacídica, que contiene siete repeticiones de una secuencia de unos 40 aminoácidos entre los que hay residuos altamente conservados. En estas secuencias conservadas aparece repetido el dipéptido Trp-Asp, motivo que se encuentra también en muchas proteínas no relacionadas funcionalmente con la transducción y que podría ser importante para establecer interacciones con otras proteínas (*Neer y col., 1994*). Las subunidades γ tienen una estructura tridimensional casi lineal, a excepción de su extremo amino-terminal helicoidal. Sufren modificaciones post-traduccionales en el extremo carboxilo-terminal (isoprenilaciones, metilaciones), lo que les confiere mayor diversidad (*Casey, 1994*). En ausencia de isoprenilación, el dímero $\beta\gamma$ se

forma pero no interacciona correctamente con la membrana ni con la subunidad α (Higgins y Casey, 1994), viéndose afectadas la activación de la proteína G por receptores y la modulación de efectores (Scheer y Gierschik, 1995). Asimismo, se ha descrito fosforilación por PKC de algunas subunidades γ , lo que podría tener relevancia fisiológica (Morishita y col., 1995). La subunidad γ se extiende a lo largo de un extremo de la estructura en hélice de la subunidad β (Figura 2), estableciéndose entre ambas una extensa zona de interacciones hidrofóbicas y polares que confieren especificidad a la unión β - γ (Katz y Simon, 1995). Alejados de la hélice β , también los extremos amino-terminal helicoidales de ambas subunidades se enrollan entre sí, estableciéndose interacciones mayoritariamente hidrofóbicas.

Por lo que respecta a sus funciones, los dímeros $\beta\gamma$ participan, en primer lugar, en el reconocimiento de las proteínas G por los receptores, los cuales presentan baja afinidad por las subunidades α disociadas. En esta función parece existir selectividad de isoformas de las subunidades β y γ , como han mostrado Kleuss y colaboradores (1992, 1993). Así mismo, su disociación de las subunidades α , cuando éstas se activan, conduce a la separación del receptor, el cual mientras que lleve unido a un ligando agonista, puede actuar de nuevo catalizando la activación de nuevas moléculas de proteínas G, amplificando, la señal. La asociación de los dímeros $\beta\gamma$ con las subunidades α incrementa su afinidad por el GDP, las estabiliza como moduladoras de efectores y permite su ADP-ribosilación por la toxina pertúsica.

Además, los dímeros $\beta\gamma$ modulan efectores directamente (Clapham y Neer, 1993; 1997). Los efectos conocidos hasta ahora incluyen la activación de un canal de K^+ , de las PLC β 1-3, de la PLA $_2$ en la retina, de la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K), de quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y de las isoenzimas AC II y AC IV (Jelsema y Axelrod, 1987; Logothetis y col., 1987; Tang y Gilman, 1991; Camps y col., 1992; Katz y col., 1992); y la inhibición directa de la AC I (Sternweis, 1981). Estas acciones cesan, al igual que las de las subunidades α , cuando éstas son inactivadas por la hidrólisis del GTP y se produce la reasociación del trímero.

3.2.- Moduladores de la función de la proteína G.

3.2.1.- RGS (Regulators of G-protein signaling).

La actividad GTPasa de las proteínas $G\alpha$ puede ser acelerada por una clase de proteínas denominadas RGS, reguladoras de la señalización de la proteína G (Berman y col., 1996; Watson y col., 1996). Se han descrito más de 30 proteínas de mamíferos (Tabla 3) que contienen dominios RGS, de ~120 aminoácidos, que es el responsable de la interacción con la $G\alpha$ (Druey y col., 1996; Koelle y Horvitz, 1996; Siderovski y col., 1996). Sin embargo, estas proteínas difieren considerablemente en su tamaño, secuencia aminoacídica y distribución en los tejidos (Gold y col., 1997). Algunas RGS son relativamente pequeñas, con un peso de 20-25 kDa, y contienen un secuencia de 23-80 aminoácidos en el N-terminal y de 2-21 aminoácidos en el C-terminal (Figura 3). Por el contrario, otras RGS contienen una secuencia larga en los dos terminales, donde se localizan distintos dominios estructurales y funcionales, entre ellos, el dominio GGL (de *G protein γ -subunit-like*), DEP (de *disheveled, egl-10, pleckstrin*), DH/PH (de *Dbl/pleckstrin homology*) y PDZ (de *PSD-95, disc-large, and ZO-1 homology*), que intervienen en las vías de transmisión de señales o en la interacción con otras proteínas (Hepler, 1999; Siderovski y col., 1999; DeVries y col., 2000).

Así, ciertas RGS al unirse a la subunidad α activada ($G\alpha$ -GTP) inhiben la interacción efectiva entre estas y los correspondientes sistemas efectores, por lo que han sido propuestas como reguladores negativos en la señalización de los receptores acoplados a proteínas G (Hepler y col., 1997; Tesmer y col., 1997); otras inhiben la señalización celular porque al permanecer unidas a $G\alpha$, impiden la reagrupación del heterotrímero, lo cual reduce el número de proteínas G que pueden ser reguladas por los receptores (Dohlman y col., 1996; 1997); RGS6, RGS7, RGS9 y RGS11 contienen el dominio GGL, a través del cual se unen a $G\beta_5$ (Snow y col., 1999); por otro lado, las RGS con un dominio AKAP (*A-kinase anchoring protein*), son responsables de la localización subcelular de la PKA y GRKs (Koch y col., 1993; Huang y col., 1997); y otras son efectores de $G\alpha_{13}$ que activan la proteína Rho (Hart y col., 1998; Kozasa y col., 1998).

Tabla 3. Proteínas de mamíferos con dominio RGS.

Proteína	Aminoácidos (n°)	Interacción con $G\alpha$	Distribución Tisular (ARNm)	Referencias
hRGS1	196	$G\alpha_i$	Células B activas	Hong y col., 1993 Newton y col., 1993
hRGS2	211	$G\alpha_q > G\alpha_i^b$	Ubícuca	Siderovski y col., 1994
hRGS3	519	$G\alpha_q, G\alpha_i$	Ubícuca	Druey y col., 1996
rRGS4	205	$G\alpha_q, G\alpha_i$	Cerebro	Druey y col., 1996
mRGS5	181	$G\alpha_i$	Corazón, pulmón, cerebro, músculo	Koelle y Horvitz, 1996 Chen y col., 1997 Seki y col., 1998
hRGS6 ^c	567	—	Cerebro	Koelle y Horvitz, 1996
hRGS7 ^c	469	$G\alpha_q, G\alpha_i$	Cerebro, retina	Koelle y Horvitz, 1996 He y col., 1998 Shuey y col., 1998
hRGS8	180	$G\alpha_i$	Cerebro	Saitoh y col., 1997
HRGS9L ^c	674	$G\alpha_i$	Cerebro, retina	Granneman y col., 1998
HRGS10	173	$G\alpha_i$	Cerebro	Hunt y col., 1996
HRGS11	467	$G\alpha_o$	Cerebro, retina, páncreas	Snow y col., 1998
RRGS12 ^c	1387	$G\alpha_i$	Cerebro, pulmón, hígado, corazón, bazo	Snow y col., 1997
HRGS13	159	—	—	Chatterjee, Fisher, 1998
RRGS14	544	—	Cerebro, pulmón, bazo	Snow y col., 1997
HRGS15	—	—	—	Koelle y Horvitz, 1996
MRGS16 ^d	201	$G\alpha_i$	Retina, pituitaria, hígado	Chen y col., 1997 Chen y col., 1997 Snow y col., 1998
HRGS-GAIP	217	$G\alpha_q, G\alpha_i$	Corazón, pulmón, hígado	DeVries y col., 1995
BRET-RGS1	374	$G\alpha_t$	Retina	Faurobert, Hurley, 1997
HRGSZ1	217	$G\alpha_z$	Cerebro	Wang y col., 1998 Glick y col., 1998
h115RhoGEF	913	$G\alpha_{13}, G\alpha_{12}$	Ubícuca	Kozasa y col., 1998 Hart y col., 1998 Mao y col., 1998
MlscRhoGEF	914	—	—	Whitehead y col., 1996
HRhoGEF	1522	—	—	Nagase y col., 1997
MD-AKAP2	372	—	Ubícuca	Huang y col., 1997
rAxin	832	—	Ubícuca	Kishida y col., 1998 Behrens y col., 1999
MConductina	840	—	Cerebro, pulmón, hígado	Kishida y col., 1998 Behrens y col., 1999
BGRK2 ^e	689	—	Cerebro	Siderovski y col., 1996

h: humano, r: rata, m; ratón (de *mouse*), b: bovino, ^b en sistemas reconstituidos, ^c lecturas alternativas del ARNm, ^d también llamada RGS-r y A28-RGS14, ^e otros miembros de las GRKs (1-6) poseen el dominio RGS.

Por todo ello, se las relaciona con la regulación de funciones celulares moduladas por proteínas G, tales como procesos endocitóticos y exocitóticos de membrana, diferenciación celular, desarrollo embrionario y proliferación celular (De Vries y col., 1999).

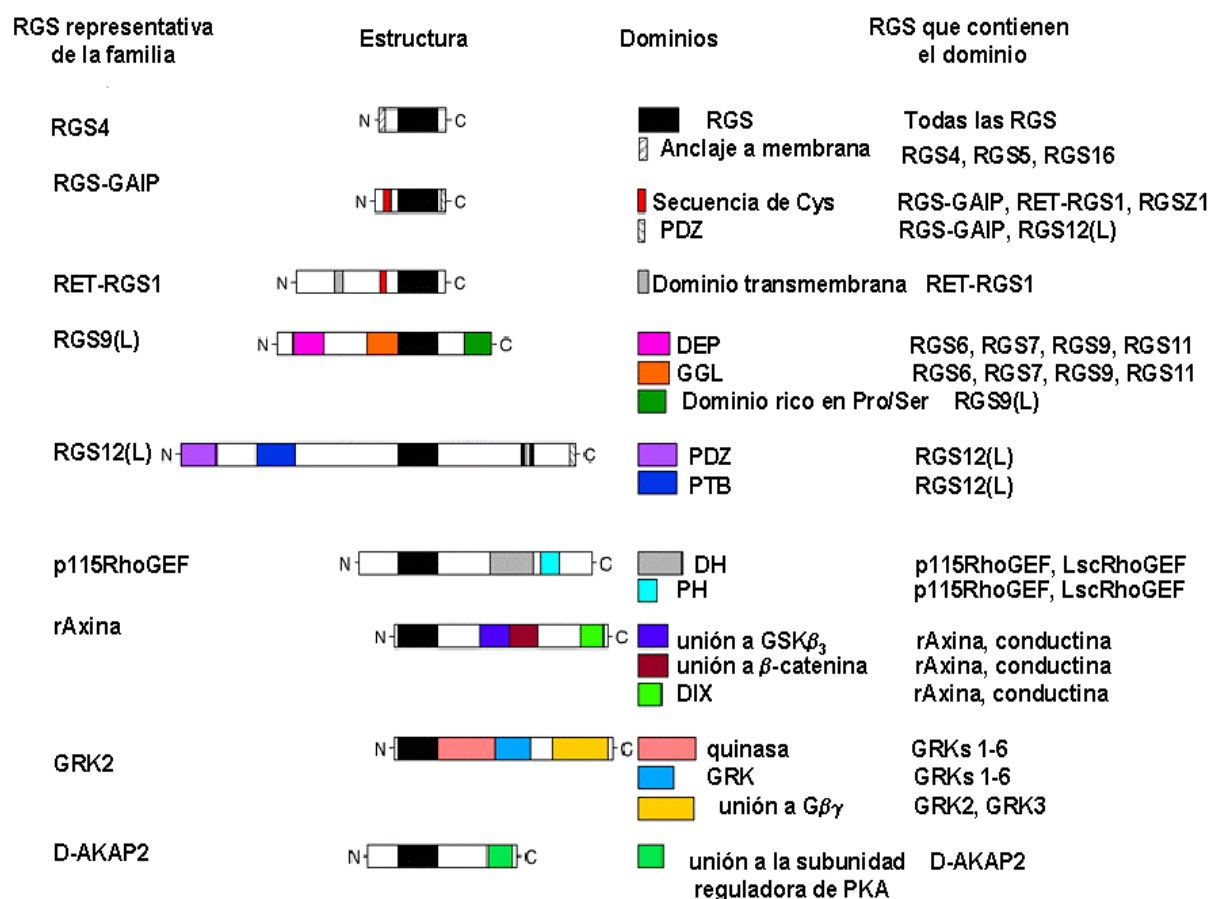


Figura 3. Diversidad de las RGS (*de regulators of G-protein signaling*). Todas contienen el dominio RGS y la mayoría de ellas presentan uno o más dominios modulares o estructurales; entre ellos: PDZ (de *PSD-95, disc-large and zo-1*), DEP (de *dishevelled, egl-10 and pleckstrin*), GGL (de *G protein gamma subunit-like*), dominio de unión a GSKβ₃ (isoforma β₃ de la quinasa de la glicógeno sintasa), dominio de unión a β-catenina; DIX (*dishevelled homology*), GRK (de *G-protein-coupled receptor kinases*), y dominio de unión a la subunidad reguladora de PKA (de *protein kinase A*).

Como regla general, casi todos los miembros analizados que estimulan la actividad GTPasa de las proteínas G (GAPs), actúan selectivamente sobre uno o más miembros de la familia Gα_i (Gα_{i1}, Gα_{i2}, Gα_{i3}, Gα_{i0}, Gα_t, Gα_z) y/o Gα_q, y no sobre Gα_s.

ni $G\alpha_{11-12}$. La determinación de la estructura cristalográfica del complejo RGS4- $G\alpha_{i1}$ -GDP-AIF4 (que mimetiza el estado activo $G\alpha$ -GTP) revela que el dominio RGS forma una hélice de nueve bucles que contacta con $G\alpha_i$ a tres niveles distintos (Figura 4) (Tesmer y col., 1997). Dos residuos de superficie de $G\alpha_{i1}$ (Thr182 y Gly183) parecen ser esenciales en la afinidad de interacción $G\alpha$ -RGS, aunque también existen otros residuos importantes (Tesmer, y col., 1997; DiBello, 1998). El hecho de que la Thr182 únicamente esté presente en $G\alpha_i$ y $G\alpha_q$, pero no en $G\alpha_s$ o $G\alpha_{12}$, podría explicar las preferencias de RGS por la unión a G_i o G_q . Así RGSZ1 prefiere $G\alpha_z$ (Wang y col., 1998; Glick y col., 1998), RGS11 a $G\alpha_o$ (Snow, 1998) y RGS2 prefiere $G\alpha_q$ (Heximer y col., 1997).

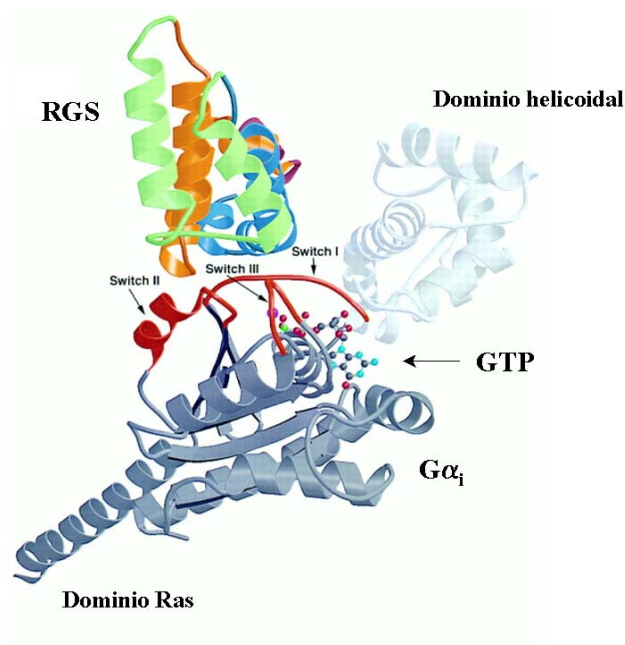


Figura 4. Estructura cristalográfica del complejo RGS- $G\alpha_i$. Se representa la estructura de la RGS 4 (en colores), y los dominios Ras (en gris) y helicoidal (en blanco) de la proteína $G\alpha_{i1}$. También se muestran las tres regiones *switch* de $G\alpha_{i1}$ (residuos 176-184, 201-215, y 233-241) y la estructura del GTP. (Tomado de Tesmer y col., 1997).

Esta familia de proteínas se expresa en diversos tejidos incluyendo el cerebro. Al menos 9 ARNm de distintas RGS son expresados en la pituitaria (Chen y col., 1997) y en regiones específicas del cerebro (Gold y col., 1997). Algunos ARNm, como los de RGS3, RGS5, y GAIP, muestran una amplia distribución tisular, que sugiere una función generalizada (DeVries y col., 1995; Druey y col., 1996; Seki y col., 1998). La

expresión de otros, como el de RET-RGS1 (retina), RGSZ1 (núcleo caudado del cerebro), RGS8 (cerebro), y RGS1 (linfocitos), es reducida, e indicaría una función especializada (Hong y col., 1993; Faurobert y col., 1997; Sayito y col., 1997; Glick y col., 1998; Wang y col., 1998). La localización nuclear de algunas RGS cuando se sobre-expresan en células (RGS2, RGS3T, y RGS10) sugiere un papel en la regulación de la activación génica (Chatterjee y Fisher, 2000; Dulin y col., 2000).

Se ha sugerido la existencia de lecturas alternativas de los genes que codifican varias RGS, entre ellas, RGS3 (Druey y col., 1996), RGS12 (Snow y col., 1998) y RGS9 (Cowan y col., 1998). Así, el ARNm de RGS9 origina la isoforma corta (RGS9-1), específica de la retina, donde actúa como GAP (de *GTPase activating protein*) de $G\alpha_t$ (Cowan y col., 1998; He y col., 1998), y la larga (RGS9-2) que se expresa, sobre todo en el estriado, donde participa en la desensibilización del receptor opioide μ (Arman y col., 1999; Granneman y col., 1998).

La capacidad de regulación de la función de la morfina sobre el receptor opioide μ , así como su participación en la desensibilización de este receptor, ha sido descrito para RGS1, RGS2, RGS3 y RGS4 (Potenza y col., 1999; Garzón y col., 2001). Estas RGS interactúan preferencialmente con determinadas proteínas G, y muestran diferentes capacidades para disminuir la respuesta a la morfina.

Recientemente, se ha descrito una interacción de las RGS con la proteína 14-3-3, que podría ser importante para la regulación de su función (Benzing y col., 2000). La 14-3-3 es una proteína de 28-30 kDa, capaz de unirse a residuos de Ser o Thr fosforilados de otras proteínas. Se expresa en muchos tejidos y predomina en neuronas (Aitken y col., 1992; 1995) e incluye 9 isoformas (α , β , γ , δ , ϵ , η , σ , τ y ξ) que participan en multitud de vías de señalización, entre las que se encuentran las vías de las proteínas G y Raf quinasa, además de la activación de proteínas quinasas, control del ciclo celular, y apoptosis (Murria, 1995; Burbelo y Hall, 1995; Zha y col., 1996; Brunet y col., 1999; Thorson y col., 1998; Torzón y col., 1998). La unión de la RGS7 a la 14-3-3, implica a la Ser434, localizada en una región que se conserva en otros miembros de la familia y que interacciona con la subunidad α , por lo que su fosforilación y

consecuente unión a la 14-3-3, resulta en una disminución de la actividad GAP de las proteínas RGS (*Benzing y col., 2000*).

Se han descrito otras proteínas que también actúan como GAP y efectores de las $G\alpha$. Este es el caso de la proteína p115RhoGEF, PLC β y PDE γ . La p115RhoGEF, LscRhoGEF y hRhoGEF son factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) para Rho (una proteína G de bajo peso molecular) que constituyen una subfamilia de proteínas con función RGS. Además, p115RhoGEF es un GAP selectivo de $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ (*Hart y col., 1998; Kozasa y col., 1998*). En este sentido, la $G\alpha_{13}$ activa estimula en Rho el intercambio de nucleótidos de guanina mediado por p115RhoGEF. Así mismo, la PLC β que es activada por miembros de la familia $G\alpha_q$, al igual que p115RhoGEF, es un GAP y regulador negativo de la función de $G\alpha_q$ (*Berstein y col., 1992*). Por otro lado, la subunidad γ de la fosfodiesterasa de GMPC (PDE γ) se une a la $G\alpha_t$, liberando la subunidad catalítica que regula los niveles de GMPC de la retina y la señalización visual. Además, la PDE γ es un GAP de la $G\alpha_t$ (*Arsahavsky y Bownds, 1992; Nekrasova y col., 1999*).

3.2.2.- Fosducina y proteínas tipo fosducina.

La fosducina (Phd) es una proteína, presente en altas cantidades en la retina, que se une con gran afinidad al complejo $G\beta\gamma$, disminuyendo la amplificación de la señal al bloquear la activación de efectores inducida por la estimulación de las proteínas G (*Gaudet y col., 1999*), e impedir la reasociación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ (*Lee y col., 1992; Miles y col., 1993*). Además, previene la desensibilización homóloga de los GPCR, porque su unión a $G\beta\gamma$ proporciona una protección frente a enzimas con actividad quinasa, las GRKs, que actúan uniéndose a estos dímeros y desde aquí, por fosforilación, inactivan a los receptores ocupados por el agonista (*Boekhoff y col., 1997; Schulz y col., 1999*).

La Phd es una proteína abundante en retina y glándula pineal que también se expresa en otros tejidos como hígado y epitelio olfatorio (*Lee y col., 1988; Craft y col., 1991; Lolley y col., 1992*). Sin embargo, su presencia en S.N.C. es muy escasa (*Lee y*

col., 1990; *Bauer y col.*, 1992; *Kuo y col.*, 1993; *Craft y col.*, 1994; *Danner y col.*, 1996; *Boekhoff y col.*, 1997). Posteriormente, se identificaron unas proteínas de estructura y función homólogas a la fosducina (*Schröder y Lohse*, 1996), que se conocen como proteínas tipo fosducina (PhLP), las cuales se expresan abundantemente en cerebro y también en otros tejidos (*Miles y col.*, 1993).

De acuerdo a la longitud de su secuencia, las PhLP se denominan PhLP_L(*de long*) y PhLP_S(*de short*). La forma larga (PhLP_L) es homóloga a la Phd, con un dominio adicional de 36 aminoácidos en el extremo amino terminal (*Craft y col.*, 1998). Su distribución tisular es amplia, incluyendo el S.N.C. y la glándula pineal (*Schröder y Lohse*, 1996; *Abe y col.*, 1998; *Craft y col.*, 1998; *Thibault y col.*, 1999). Por el contrario, la PhLP_S es una forma truncada de PhLP que carece de los 83 aminoácidos situados en el extremo N terminal, y por tanto, de la secuencia implicada en la interacción a Gβγ. El resto de su secuencia presenta un 50% de identidad con la Phd y aunque también puede unirse al dímero Gβγ, lo hace con una afinidad 5 veces menor que la de Phd (*Schröder y Lohse*, 1996). Su expresión está limitada a la retina (*Abe y col.*, 1998).

En células de la retina, se ha descrito que la mayor parte de la Phd se localiza en las regiones sinápticas (*Lee y col.*, 1988; *Nakano y col.*, 2001). Tras la activación de un receptor la Phd se une con alta afinidad a las subunidades βγ de las proteínas G, a través de un dominio de 11 aminoácidos localizado en el extremo N-terminal de la proteína, que como ya hemos mencionado anteriormente, también está presente en PhLP_L (*Xu y col.*, 1995; *Hawes y col.*, 1994). Esta unión no es selectiva con respecto a los subtipos de β o γ (*Muller y col.*, 1996), y se afecta por la fosforilación de la Phd en la Ser73, o la equivalente en la PhLP_L (Ser110) de PKA (*Bauer y col.*, 1997; *Craft y col.*, 1998). Actualmente se ha descrito una interacción de la Phd fosforilada con proteínas 14-3-3 de membrana que podría regular su función en la retina (*Nakano y col.*, 2001).

La estructura cristalográfica del complejo Phd-G_iβγ revela que la fosducina posee dos dominios que no interaccionan entre sí, pero desarrollan una amplia superficie de contacto con el dímero Gβγ (Figura 5). En el dominio N-terminal (de 105 aminoácidos), compuesto por dos hélices, es donde se localizan los aminoácidos

fundamentales que establecen contacto con el centro de la β , la misma zona con la que interacciona las regiones *switch* de $G_t\alpha$ (Lambright y col., 1996; Loew y col., 1998) y varios efectores (Ford y col., 1998). La Ser73 se localiza en una región flexible de este dominio (residuos 37 al 66) que no contacta con $G_t\beta\gamma$ (Gaudet y col., 1996), y es accesible a PKA, incluso cuando forma el complejo con el dímero (Wilkins y col., 1996).

El dominio carboxilo terminal, tiene la misma estructura que la tiorredoxina, pero carece de actividad funcional (Hawes y col., 1994; Gaudet y col., 1996; Tanaka y col., 1997), y se une a la zona de la $\beta\gamma$ implicada en la unión a la membrana y la interacción con el receptor (Lambright y col., 1996). En este sentido se ha propuesto que el dímero se libera de la bicapa lipídica, y el farnesilo de la γ , a través del cual se ancla a la membrana, es alojado en una pequeña cavidad existente entre la fosducina y la $G_t\beta\gamma$ (Loew y col., 1998).

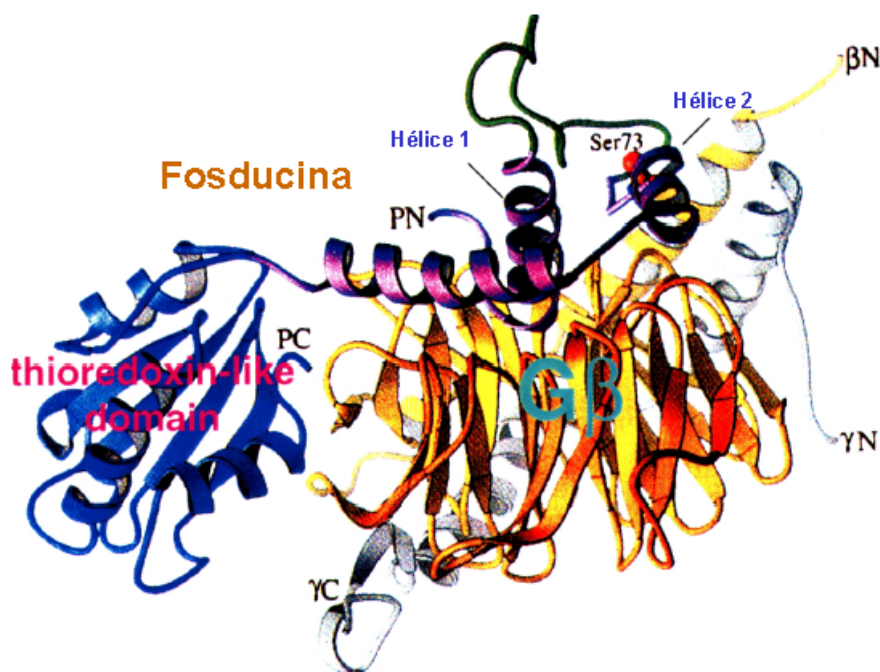


Figura 5. Estructura cristalográfica de la fosducina (Phd) y el dímero $G\beta\gamma$ de la transducina. Se señalan los dominios N- (PN) y C-terminales (PC) de la Phd; las hélices 1 y 2 del PC, que establecen contacto con la $G\beta$; el dominio estructural de la Phd semejante a la tiorredoxina (*thioredoxin-like domain*); y los extremos N y C terminales de las subunidades β y γ de la proteína G. (Tomado de Schulz, 2001).

4.- Efectores y respuesta celular.

Los opioides modulan la liberación de muchos neurotransmisores en el S.N.C. y periférico. Su efecto predominante es la inhibición de la transmisión sináptica, que se considera el mecanismo que subyace a la analgesia opioide (*Smart y col., 1994*) y que es consecuencia de un conjunto de acciones como inhibición de la formación de AMPc (*Sharma y col., 1977; Uhl y col., 1994*), cierre de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (*Surprenant y col., 1990; Porzig, 1990; Tallent y col., 1994*), e incremento de la conductancia al K^+ (*North y col., 1987; Ikeda y col., 1995*), lo que genera hiperpolarización de la célula.

Los opioides poseen además otras acciones centrales y periféricas, tanto estimulantes como depresoras (euforia, hipotensión, miosis, disminución de la motilidad intestinal). El sistema opioide participa en la regulación de la actividad motora, ingesta, temperatura corporal, presión arterial, respiración, etc. (*Olson y col., 1991; 1993*) Algunas de estas acciones son muy relevantes y hacen que el uso de analgésicos opioides comporte grandes riesgos (tales como la depresión respiratoria).

Además de la inhibición de la transmisión sináptica, que puede resultar en excitación de una vía si se ejerce presinápticamente sobre interneuronas inhibitorias no opioides (*Leslie, 1987*), los opioides poseen efectos excitadores directos sobre determinadas células nerviosas (*Crain y Shen, 1990; Lin y Carpenter, 1994, Neal y col., 1994*) y sobre rutas de segundos mensajeros, al estimular la formación de AMPc (*Cruciani y col., 1993; Olanas y Onali, 1995*), e inositoltrisfosfato (IP_3) (*Miyamae y col., 1993; Smart y col., 1994; Tsu y col., 1995*), incrementar la concentración intracelular de Ca^{2+} (por entrada del exterior o movilización de calcio intracelular), o activar la proteína quinasa C y la proteína quinasa A (*Smart y Lambert, 1996a*), y las proteínas quinasas activadas por mitógenos ERK1 y ERK2 (*Li y Chang, 1996; Fukuda y col., 1996; Burt y col., 1996*) (Figura 6).

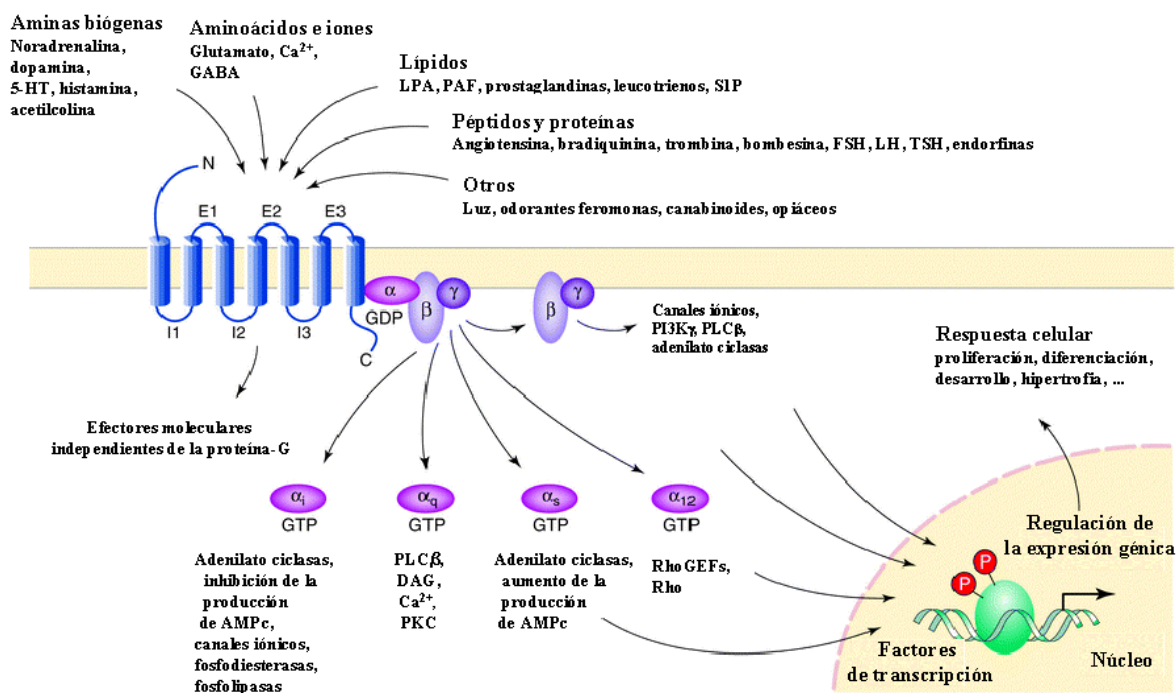


Figura 6. Diversidad de los GPCRs para transmitir la señal al interior de la célula. DAG: diacilglicerol, FSH: hormona estimuladora del folículo; GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina, LH; hormona luteinizante; LPA: ácido lisofosfatídico; PAF: factor activador de plaquetas; PI3K: fosfoinosítido 3-quinasa; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfolipasa C; SIP: esfingosina-1-fosfato; TSH; hormona estimuladora de la tiroides.

4.1. Canales iónicos.

4.1.1.- Canales de Ca²⁺.

Los opioides modulan la liberación de neurotransmisores por inhibición de los diferentes tipos de canales de Ca²⁺ (impidiendo la entrada de Ca²⁺ a la célula) en muchas regiones del cerebro de los mamíferos. Por ejemplo, los receptores opioides μ y κ inhiben los canales de Ca²⁺ tipo N- y P/Q en el núcleo del tracto solitario de la rata (*Rhim y Miller, 1994*), posteriormente se describió que los receptores opioides μ, pero no los δ o κ, son responsables de la modulación de la corriente de los canales de Ca²⁺ en neuronas de la sustancia gris periacueductal de ratón (*Connor y col., 1999*).

Con el clonaje de las múltiples subunidades que integran los canales de Ca^{2+} se pudo demostrar que algunos de estos canales son regulados por el sistema de la adenilato ciclasa (Randall, 1998) y la modulación de los diferentes canales de Ca^{2+} por los agonistas opioides ha podido ser estudiada al expresar en la misma célula los receptores opioides y las subunidades de canales de Ca^{2+} . Así, en células NG108-15, el receptor opioide μ de rata se acopla funcionalmente a los canales de Ca^{2+} tipo N sensibles a ω -conotoxina (Morikawa y col., 1995).

Con estos estudios, también se ha demostrado la inhibición que los receptores opioides μ y δ clonados ejercen sobre los canales de Ca^{2+} tipo L vía proteínas G_i/G_o en células pituitarias GH3 (Piros y col., 1995; 1996) y el acoplamiento funcional de los canales de Ca^{2+} a los receptores κ . (Kaneko y col., 1994). Al menos los canales de Ca^{2+} compuestos por las subunidades α_{1a} , α_{1b} , o α_{1E} son inhibidos por el receptor μ (Bourinet y col., 1996), y se desconoce si los canales formados por otras subunidades α_1 puedan ser igualmente regulados por receptores opioides.

En otro sentido, también se describió la participación de las proteínas G_o en la inhibición de los canales de Ca^{2+} inducida por los opioides (Hescheler y col., 1987) y posteriormente se confirmó utilizando anticuerpos específicos frente a esta proteína (Moisés y col., 1994). Hasta la fecha, no se ha estudiado si la inhibición del canal de Ca^{2+} es mayor por $G\beta\gamma$ que por $G\alpha_o$.

La expresión de $G\beta\gamma$ en neuronas de rata mimetiza la inhibición inducida por los GPCRs de las corrientes de Ca^{2+} (Ikeda y col., 1996), y resultados similares fueron obtenidos cuando se coexpresa $G\beta\gamma$ con distintas subunidades de los canales de Ca^{2+} en sistemas de expresión heterólogos (Herlitze y col., 1996). Aunque las subunidades $G\beta\gamma$ son responsables de mediar la inhibición de los canales de Ca^{2+} , la $G\alpha_o$ es indispensable para el acoplamiento de los receptores opioides a sus efectos dependientes de $G\beta\gamma$. Las evidencias más consistentes se obtienen de ratones *knock-out* de $G\alpha_o$. En neuronas de la raíz del ganglio dorsal, obtenidas de estos animales, que se muestran hiperalgésicos, la

capacidad de los agonistas opioides para inhibir los canales de Ca^{2+} está disminuida (Jiang y col., 1998).

La regulación de la actividad del canal de Ca^{2+} en neuronas, resulta de la fosforilación y estimulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo N por la PKC, antagonizando la inhibición mediada por la proteína G (Zamponi y col., 1997). Así, en neuronas de la raíz del ganglio dorsal de rata, la activación de los receptores opioides κ y μ disminuye la corriente de Ca^{2+} tipo N mientras que la activación de PKC produce un efecto opuesto (King y col., 1999). Sin embargo, la inhibición de las subunidades del canal de Ca^{2+} neural por el receptor opioide κ no se afecta por las acciones de PKA y PKC (Kaneko y col., 1994), pudiendo existir una transmodulación adicional (*cross-talk*) de las proteínas G con otras moléculas de señalización, que explicaría porque los agonistas κ estimulan más que inhibir los canales de Ca^{2+} tipo L en la placenta humana (Cemerikic y col., 1998).

Desde hace tiempo es conocido que el calcio, pero no otros iones divalentes, antagoniza la acción analgésica de la morfina en tratamiento agudo (Kakunaga y col., 1966), y que el lantano, un antagonista del calcio, induce analgesia cuando se inyecta en aquellos sitios del sistema nerviosos donde la morfina ejerce su acción analgésica (Harris y col., 1975). La capacidad de los opiáceos de reducir la disponibilidad del calcio repercute en un elevado número de procesos que requieren calcio, tales como activación de enzimas, actividad de proteínas calcio-dependientes o regulación de vesículas de distintos neurotransmisores. La acción de la morfina sobre el calcio de las membranas sinaptosómicas se invierte completamente cuando el opioide actúa de forma crónica: las membranas sinaptosómicas incrementan su contenido en calcio y su capacidad de fijarlo, lo que puede ser un mecanismo importante de adaptación celular que explique el desarrollo de la tolerancia y dependencia (Guerrero-Muñoz y col., 1979).

4.1.2.- Canales de K^+ .

A nivel postsináptico muchos GPCRs activan los canales de K^+ , e hiperpolarizan la membrana celular, evitando la propagación del potencial de acción. El acoplamiento a

canales de K^+ , tanto de receptores μ (en el locus coeruleus) como de receptores δ (en el plexo submucoso de cobaya) fue descrito por North y colaboradores (1987). Los receptores κ , sin embargo, se comportan de manera diferente, directamente relacionada con el Ca^{2+} intracelular (Adamson y col., 1988). Posteriormente, estudios electrofisiológicos demuestran que los tres tipos de receptores opioides son capaces de activar los canales K_G vía proteínas G sensibles a PTX (Grudt y Williams, 1993; Henry y col., 1995; Schneider y col., 1998). La relevancia fisiológica de esta regulación sugiere un efecto cardioprotector, que ha sido demostrado, para el receptor opioide δ_1 , en ratas que presentan una lesión en la arteria coronaria (Schultz y col., 1998).

Con el clonaje de los canales K_G se ha podido estudiar, a nivel molecular, la relación entre su estructura y función y describir el mecanismo de activación por $G\beta\gamma$ (Lim y col., 1995). Al menos 12 subunidades diferentes lo componen y son responsables de su complejidad y diversidad. GIRK1 es una de las principales subunidades, que interacciona con varios tipos de $G\beta$ (Yan y Gautaman, 1996), lo que hace suponer que la diferente capacidad de los receptores opioides de activar los canales K_G se debe a sus asociaciones con distintas proteínas G, que a su vez contienen diferentes subunidades $G\beta$. Sin embargo, la especificidad de interacción con K_G es menor cuando $G\beta$ está ligada a $G\gamma$ (Lim y col., 1995).

Un estudio reciente propone que el fosfatidil-D-mioinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) está involucrado en la activación, inducida por $G\beta\gamma$, de los canales de K_G (Huang y col., 1998) y plantea la posibilidad de un mecanismo de regulación indirecto, por receptores opioides, de la actividad del canal mediado por el metabolismo de PIP_2 .

Por otro lado, la incubación crónica con morfina de células del locus coeruleus de rata da lugar a una disminución del aumento de la conductancia al K^+ provocado por los agonistas μ (Christie y col., 1987). Este proceso adaptativo no se debe a cambios directos en las propiedades del canal de K^+ , ya que, en estas condiciones, la capacidad de otros fármacos que actúan a través de este canal no se altera, lo que parece sugerir que un desacoplamiento entre el receptor μ y los canales de K^+ sería el responsable del fenómeno. Además, estudios recientes revelan en la amígdala de rata, la existencia de

un canal de K^+ (130-pS) activable por el receptor opioide μ , cuyos efectos descienden después del tratamiento crónico con morfina, lo que podría resultar en uno de los mecanismos responsables de la tolerancia opioide (Chen y col., 2000).

4.1.3.- Otros canales iónicos.

Aparte de los canales de Ca^{2+} y K^+ los receptores opioides regulan las funciones de otros canales iónicos. Por ejemplo, las corrientes excitatorias postsinápticas producidas por los receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) en el giro dentado del hipocampo son inhibidas por agonistas del receptor opioide μ (Xie y Lewis, 1997).

La toxina pertúsica (PTX) así como los activadores e inhibidores de PKA previenen y revierten la reducción de las corrientes de NMDA inducidas por opioides μ , lo que indica la implicación de las proteínas $G_{i/o}$ y PKA en este efecto. Es interesante señalar que los receptores opioides pueden ser recíprocamente modulados por NMDA. La incubación aguda de las células NG108-15 con NMDA disminuye significativamente la capacidad del agonista δ , DPDPE, para inhibir la producción de AMPc estimulada por forskolina (Cai y col., 1997) y la unión de [^{35}S]GTP γ S, por un mecanismo que implica la fosforilación de $G\alpha_{i2}$ por PKC (Fan y col., 1998). Este efecto inhibitorio del NMDA es también observado para los receptores opioides μ y κ en cultivos primarios de neuronas. La capacidad de NMDA de disminuir la inhibición de la AC inducida por el opioide, sugiere que otros efectores de los receptores opioides deben ser igualmente afectados por NMDA (Cai y col., 1997).

Numerosos estudios demuestran que los antagonistas del receptor de NMDA atenúan el desarrollo de tolerancia a la morfina, mediada por el receptor opioide μ , sin embargo, no siempre apoyan el papel del receptor de NMDA en el desarrollo de tolerancia a los efectos antinociceptivos de los opioides κ o δ (Kolesnikov y col., 1993, 1994; Elliot y col., 1994; Bilsky y col., 1996a). Recientemente, se ha descrito que el antagonista del receptor de NMDA, LY235959, previene los cambios que subyacen al tratamiento crónico con agonistas del receptor opioide μ , en función de su magnitud en el sistema opioide (Allen y Dykstra 2000).

4.2.- Adenilato ciclasa.

Un efecto agudo opioide es la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC), lo que origina disminución de los niveles intracelulares de AMPc. Este segundo mensajero actúa sobre diversas moléculas diana (la proteína quinasa A, PKA, es quizá la más importante) y así, regula el metabolismo, transcripción genética, proliferación y diferenciación celulares.

En mamíferos hay al menos 9 isoenzimas de AC (*Hurley, 1998*), que difieren en su actividad basal y, aunque todas son estimuladas por subunidades α_s y forskolina, son reguladas de forma diferente por diversas moléculas, subunidades $\alpha_{i/o}$ o dímeros $\beta\gamma$, Ca^{2+} /calmodulina y PKC (*Tang y Gilman, 1992; Iyengar, 1993; Jacobowitz y col., 1993; Cooper y col., 1997*). Así por ejemplo, el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de distintas isoformas de la enzima puede ser nulo (ACII, IV, VII o IX), estimulador (ACI, III o VIII) o inhibidor (ACV o VI). Los dímeros $\beta\gamma$ pueden no afectar (ACV, VI, IX), activar (ACII, IV y VII) o inhibir (ACI) a la enzima, mientras que la PKC estimula únicamente a algunas isoformas (ACII, VII) (*Cooper y col., 1995; Premont y col., 1996*).

Las distintas isoformas de AC tienen un peso molecular aproximado de 120 kDa (entre 1064 y 1248 residuos aminoacídicos). Presentan un corto extremo amino terminal orientado hacia el citoplasma, seguido de seis dominios transmembranales (designados M1) y un gran dominio citoplasmático (C1 de unos 40 kDa). Este motivo estructural se repite, de nuevo, con un segundo módulo, formado por seis dominios transmembranales (M2) que continúan en otro dominio citoplasmático de ~40 kDa (C2) (Figura 7).

La similitud, en su conjunto, de la secuencia aminoacídica entre las distintas isoformas es aproximadamente del 50%, pero si se analiza cada subdominio por separado, pueden observarse mayores homologías. En este sentido, los dominios citoplasmáticos requeridos para la catálisis, y referidos como C_{1a} y C_{2a} (*Tang y col., 1995; Yan y col., 1997*), están más conservados (hasta un 93% de identidad de secuencia).

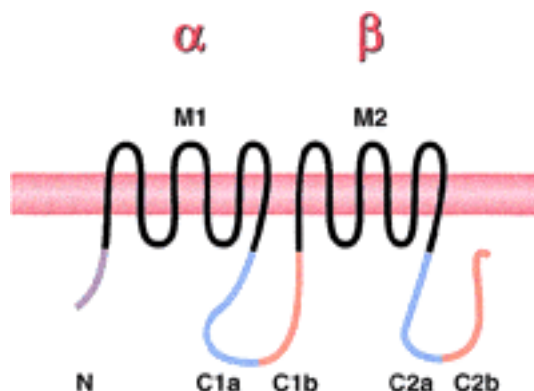


Figura 7. Estructura proteica de la adenilato ciclasa. N es el extremo amino terminal, M1 y M2 constituyen los dominios transmembranales, C1a y C2a son las regiones de alta homología de secuencia aminoacídica entre las distintas isoformas y C1b y C2b el resto de la secuencia.

Estudios con PTX y anticuerpos específicos frente a la $G\alpha$ sugieren que la G_{i2} media la inhibición de la AC del receptor opioide δ en células NG108-15 (Hsia y col., 1984; McKenzie y Milligan, 1990) y la G_o del μ en la línea celular SHSY5Y y membranas del cerebro (Carter y Medzihradsky, 1993). Posteriormente, se demostró que los tres tipos de subunidades $G\alpha_i$ ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$) y la $G\alpha_z$, insensible a PTX, inhibían la actividad ciclasa tras la activación del receptor opioide (Wong y col., 1991; 1992; Chan y col., 1995; Lai y col., 1995; Tsu y col., 1995; Selley y col., 1998).

Por otro lado, se ha descrito el efecto estimulador de la AC por los opioides en membranas de cerebro de rata (Puri y col., 1975), en la línea celular F-11 (Cruciani y col., 1993) y bulbo olfatorio de rata (Olianas y Onali, 1995), siendo de particular relevancia la capacidad de los complejos $\beta\gamma$ para estimular a las isoenzimas tipo II, IV y VII en estos sistemas. Muchos de los receptores inhibidores clásicos (por ej., α_2 -adrenérgicos y receptores de dopamina D_2) estimulan la AC II a través del complejo $G\beta\gamma$ liberado tras la activación de las proteínas G_i (Federman y col., 1992; Tsu y col., 1995), siendo necesaria la presencia en el medio de subunidades $G\alpha_s$ activas ($G\alpha_s - GTP$) (Federman y col., 1992; Taussig y col., 1994). Se trata por tanto de un proceso sinérgico de activación en el que la AC puede actuar como detector molecular de coincidencia temporal de señales.

La complejidad y versatilidad del sistema de la adenilato ciclasa en mamíferos permite a los opioides estimular la producción del AMPc por otras rutas. Teniendo en cuenta que la AC I y VIII son activadas por Ca^{2+} /calmodulina, y que las actividades basales del tipo II, IV y VII son elevadas cuando esta enzima es fosforilada por PKC, hay que considerar que, debido a la capacidad de los receptores opioides de estimular la PLC y movilizar el Ca^{2+} intracelular, el aumento que los opioides ejercen sobre los niveles basales de AMPc en células SK-N-SH involucra la entrada de Ca^{2+} y la activación de calmodulina (*Sarne y col., 1998*).

Además, según las condiciones del medio celular, el receptor opioide μ puede inhibir la actividad de la ACV y estimular la VII (*Yoshimura y col., 1996*). La administración crónica de opioides va asociada a una marcada regulación a la alta del sistema AC/AMPc/PKA, efecto opuesto al de su administración aguda (*Nestler y col., 1996*). Los trabajos iniciales de Sharma en la línea celular NG108-15 ponen de manifiesto el efecto inhibitorio inicial de los opioides sobre la actividad de la AC, seguido de un proceso de adaptación durante el cual los niveles de AMPc intracelular retornan a valores normales como consecuencia de la sobreactivación de la enzima (*Sharma y col., 1975*). Las consecuencias de la *up-regulation* del sistema AC/AMPc/PKA sobre fosforilación de proteínas y expresión génica parecen ser mecanismos claves subyacentes a la tolerancia y dependencia opioides.

En S.N.C. se han descrito aumentos en la actividad o en los niveles de expresión de AC y PKA en locus coeruleus y núcleo acumbens tras tratamiento crónico con opioides, lo que repercute en un incremento de la excitabilidad neuronal (*Nestler y col., 1993; Matsuoka y col., 1994; Self y col., 1995*). A la *up-regulation* del sistema de AMPc en núcleo acumbens también podría contribuir la disminución de los niveles de proteínas $\text{G}\alpha_i$ observada específicamente en esta estructura (*Terwilliger y col., 1991*).

El AMPc ejerce sus efectos en las células animales principalmente activando la enzima proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual en su estado inactivo, es un complejo formado por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras que unen AMPc. La especificidad de la quinasa, se debe, en parte, a su distribución en

los distintos compartimentos celulares, a través, de su interacción con unas proteínas de anclaje de PKA (AKAPs de *A-kinase Anchoring proteins*) que se unen a las subunidades reguladoras de la quinasa, situándola cerca de sus sustratos (*Edwards y Scott, 2000*). La unión de AMPc altera la conformación de las subunidades reguladoras, que se disocian del complejo. De manera que las subunidades catalíticas liberadas, resultan activas para fosforilar específicamente determinadas moléculas proteicas, y regular así su actividad.

Numerosas evidencias apoyan la participación de PKA en los procesos de tolerancia opioide del receptor opioide μ (*Chen and Yu, 1994; Mestek y col., 1995; Narita y col., 1994, 1995*). Sin embargo, la PKA no parece mediar la *down-regulation* de este receptor, inducida por los agonistas (*Shen y col., 2000*).

Además, una de las dianas nucleares de la ruta del AMPc es el factor de transcripción CREB (de *cyclic AMP-responsive element-binding protein*), que regula la transcripción de algunas proteínas claves en rutas de señalización. La actividad de CREB y sus niveles de expresión están sometidos a regulación por administración crónica de opioides (*Guitart y col., 1992; Widnell y col., 1996*). También, se ha demostrado la relación de CREB y el síndrome de abstinencia morfínico, al observar una atenuación de este síndrome, en ratones que presentan una mutación en el gen que codifica las isoformas α y δ de CREB (*Maldonado y col., 1996*).

4.3.- Fosfolipasa C.

Un importante número de receptores acoplados a proteínas G, entre ellos los opioides, intervienen en la activación de la PLC en el tejido nervioso, y promueven la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), lo que da lugar a inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Ambos compuestos actúan como segundos mensajeros: el primero, movilizandando Ca²⁺ intracelular, y el segundo, activando la proteína quinasa C (PKC); a través de estas acciones, regulan diversas funciones celulares

Se han identificado 10 isoenzimas de la PLC que, por sus características de secuencia, se han clasificado en tres familias: PLC β 1-4, PLC γ 1-2 y PLC δ 1-4 (*Exton,*

1994; Lee y Rhee, 1995). Todos son monómeros y poseen un peso molecular aproximado de 85 kDa (PLC- δ) y 150 kDa (PLC β y PLC γ).

Presentan dos zonas de alta homología, denominadas X (de unos 170 aminoácidos) e Y (de unos 260 aminoácidos), precedidas por un segmento de secuencia variable de unos 300 aminoácidos en el extremo N terminal (Figura 8). Ambas zonas X e Y, parecen constituir el dominio catalítico, y en las PLC γ están separadas por un segmento que contiene dominios homólogos de regiones conservadas en tirosina quinasas de la familia *Src* y otras familias. Estos dominios, llamados SH₂ y SH₃, constituyen lugares de reconocimiento de fosfotirosinas y de zonas ricas en prolina de las proteínas del citoesqueleto, respectivamente, y permiten el reclutamiento a la membrana de estas fosfolipasas, que son proteínas solubles en condiciones basales.

Además, todas ellas, presentan un dominio de homología a pleckstrina (PH) capaz de asociarse a PIP₂, un módulo EF flexible que une el dominio PH con el resto del enzima, y el dominio C2 que fija el dominio catalítico a la membrana y le permite un contacto adecuado con su sustrato.

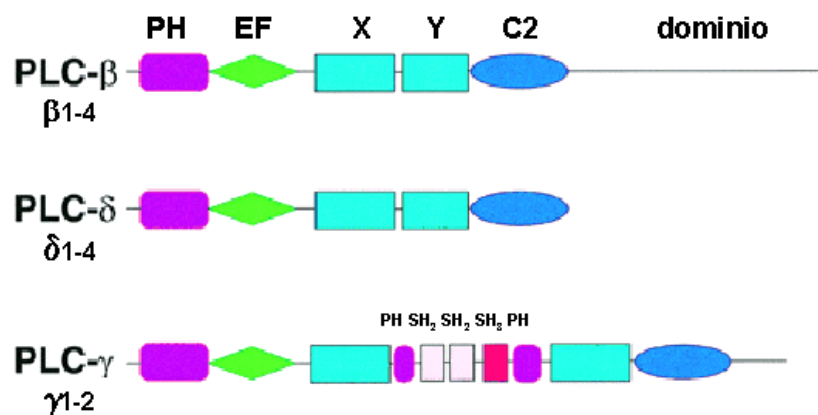


Figura 8. Representación lineal de los dominios identificados en los tres tipos de PLC: X e Y (catalítico), PH (de homología a pleckstrina), EF (de unión), SH (SH₂ y SH₃) y C2.

4.3.1.- Inositol trifosfato y movilización de Ca^{2+} .

La capacidad de los receptores opioides de regular la PLC β y movilizar el Ca^{2+} intracelular ha sido demostrada por la estimulación de la formación de mio-inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP $_3$) inducida por los receptores δ en células NG108-15 (*Jin y col., 1992; Smart y Lambert, 1996*), y células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (*Smart y col., 1994*). El mismo efecto se observó con el receptor opioide δ clonado en células Ltk $^-$ transfectadas (*Tsu y col., 1995*), y con el receptor opioide μ de rata en células CHO transfectadas (*Smart y col., 1997*). Las proteínas G sensibles a PTX, que median la transmisión de señales en estos sistemas, son incapaces de activar la PLC β (*Chan y col., 1995*), lo que sugirió la participación de los dímeros G $\beta\gamma$. Este hecho es consistente con la alta DE $_{50}$ de los opioides que es requerida para estimular la formación de IP $_3$.

Además, la participación de los subtipos del receptor opioide δ en la estimulación de la formación de los inositol fosfatos, ha sido demostrada en la sustancia gris periacueductal de ratón (*Rodríguez-Díaz y col., 1998*). Por otro lado, la participación de otras vías en este efecto, como la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L, mediada por agonistas del receptor μ , en células SH-SY5Y (*Smart y col., 1995*), o la inhibición de la PLC β , que ejercen las proteínas G $_{i1}$, a través del receptor κ , en el cerebelo del cobaya (*Misawa y col., 1995*), también ha sido descrita. No se conoce cual es la relevancia fisiológica de tal inhibición, pero debe considerarse que el receptor κ produce otras respuestas atípicas a los opioides en la regulación del Ca^{2+} (*Cemerikic y col., 1998*) y los canales de K $^+$ (*Baraban y col., 1995*).

La capacidad de los diferentes receptores opioides para estimular la PLC β , está determinada, en parte, por las proteínas G a las que se acopla en un determinado tipo de célula. Con el uso de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) específicos a los ARNm de las subunidades G α , se demostró que la movilización de Ca^{2+} inducida por los opioides en células híbridas de la raíz del ganglio dorsal x neuroblastoma ND8-47 es mediada por G α_{i2} (*Bian y col., 1998*), mientras que la G α_{i1} parece ser utilizada por los opioides μ y κ en ovocitos de *Xenopus* (*Ueda y col., 1995*). Además, los tres tipos de

receptores activan la PLC β 3 vía G $\beta\gamma$ liberadas de G $_{12}$ o G $_o$ en el músculo liso intestinal (Murthy y col., 1996).

En contraste, en las células de neuroblastoma, SK-N-BE humanas, el mecanismo involucrado en la movilización del Ca $^{2+}$ de los depósitos intracelulares sensibles a rianodina, inducido por los receptores opioides δ , no es dependiente de proteínas sensibles a PTX G $_i$ /G $_o$ (Allouche y col., 1996). La posibilidad de que este efecto estuviera regulado por proteínas G insensibles a PTX se demostró por expresión en la misma célula del receptor opioide μ con G α_{16} en la línea COS-7 (Offermanns y Simon, 1995); posteriormente, se describió que los receptores opioides δ y κ son más eficaces en estimular la PLC β vía G $_{16}$. De hecho, los valores de la DE $_{50}$ de sus respectivos agonistas fue \sim 50 veces mayor que la observada para la inhibición de la AC mediada por G $_i$ (Lee y col., 1998), lo que hace suponer que el acoplamiento de los receptores opioides a G $_{16}$ frente a G $_i$ proporciona un mecanismo que diferencialmente activa los dos sistemas por control de la concentración del agonista.

En cuanto a la relevancia fisiológica de la activación de PLC β por opioides, pocos efectos se han asociado con el aumento del IP $_3$ intracelular. Se sabe que la PLC β 1 está implicada en la analgesia supraespinal de los agonistas δ , porque en los ratones tratados con ODNs específicos de G α_{12} , G α_{13} , G α_{o1} , G α_{o2} , G α_q , G α_{11} , o PLC β 1 la respuesta antinociceptiva de sus agonistas está disminuida (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1998). Además, en células T la activación del receptor opioide δ estimula la movilización del Ca $^{2+}$ (Sharp y col., 1998) y la secreción de interleucina (IL)-2 vía G α_{16} (Hedin y col., 1997, Zhou y col., 1998).

4.3.2.- Diacilglicerol y activación de PKC y quinasas dependientes de Ca $^{2+}$.

Por otro lado, el DAG formado por la hidrólisis del PIP $_2$ permanece en la membrana y activa a la PKC, una proteína quinasa dependiente de fosfolípidos que fosforila proteínas con restos Ser y Thr, y las quinasas dependientes de Ca $^{2+}$.

Existen 11 isoenzimas de PKC, agrupadas en tres familias: *c* (clásicas: α , β I, β II, γ), *n* (nuevas: δ , ϵ , η , θ , μ) y *a* (atípicas: ξ , λ). Todas son monómeros de una estructura lineal, con peso molecular entre 68 y 84 kDa, que presentan dos dominios: uno catalítico, en la región carboxilo terminal y otro regulador, en la amino terminal (Figura 9). En su estructura se han identificado cuatro regiones de secuencia constante: dos de ellas, C₁ y C₂, ubicadas en el dominio regulador y las otras dos, C₃ y C₄, en el catalítico. Estas últimas están presentes en todas las isoenzimas y corresponden a los lugares de unión del ATP y la proteína sustrato, respectivamente. La región C₂ sólo está presente en las PKC*c* y es un dominio de unión de Ca²⁺ y fosfolípidos implicado en el mecanismo de traslocación del enzima. La región C₁, presente en las isoenzimas PKC*c* y PKC*n*, contiene motivos ricos en Cys que constituyen el lugar de unión del DAG y de los ésteres de forbol, análogos al DAG, que activan irreversiblemente y desensibilizan la PKC. Esta región contiene también una secuencia pseudosustrato que podría bloquear el centro catalítico de la PKC en ausencia de estimulación y liberarse cuando el enzima se activa.

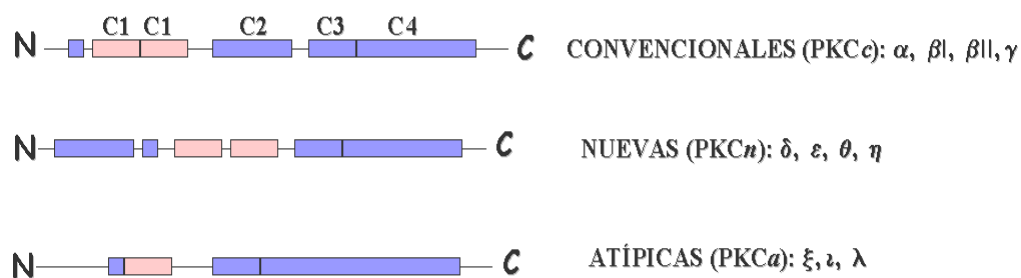


Figura 9. Representación lineal de los dominios identificados en las distintas clases de PKCs.

Se sabe que las PKC*c* son activadas por Ca²⁺, DAG, ácidos grasos insaturados y lisofosfolípidos; que las PKC*n* no requieren Ca²⁺ (no tienen el dominio C₂) y se activan por DAG y ácidos grasos, y que las PKC*a* no se activan por Ca²⁺ o DAG, pero sí por ácidos grasos. De acuerdo con estas características, la activación de las isoformas PKC*c* y PKC*n* podrá ser consecuencia de la estimulación de la PLC, que genera DAG y promueve la movilización de Ca²⁺, pero también de la estimulación de otras fosfolipasas

que igualmente pueden dar lugar a DAG o producir liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos.

La mayoría de las isoenzimas de PKC inactivas se localizan en la fracción citosólica o asociadas con estructuras subcelulares como el aparato de Golgi, probablemente unidas a proteínas que se denominan RICKs (de *Receptor Inactive C-Kinase*) (Mochly-Rosen y col., 1990). Tras su activación, la PKC sufre un cambio conformacional que permite su unión a receptores para la quinasa C activa (RACK de *Receptor Active C-Kinase*), que son proteínas del complejo multi-enzimático AKAP79 (Klauck y col., 1996), las cuales modulan su localización celular (Mochly-Rosen y col., 1991) y estabilizan la forma activa de PKC facilitando el acceso de sus sustratos (Ron y Mochly-Rosen, 1995). La interacción entre las PKCs activas y las RACKs requiere Ca^{2+} y fosfatidilserina, y es aumentada en presencia de diacilglicerol (Mochly-Rosen y col., 1991).

La participación de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en las vías de señalización de los GPCR, incluidas las ERKs (de *Extracellular signal Regulated protein Kinases*) y las JNKs (de *Jun protein Kinases*), puede ser directamente regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular, y/o la activación de la PKC (Van Dijk y col., 1997; Van der Hoeven y col., 2000).

En células NG108-15 se ha demostrado que la fosforilación de PLC β 3 por PKC rápidamente atenúa el recambio de fosfoinosítidos inducido por opioides (Strassheim y col., 1998). Este mecanismo de retroinhibición (*feedback* negativo) limita la implicación de la PLC β en las acciones crónicas de los opioides.

En consideración a las quinasas dependientes de Ca^{2+} , la morfina estimula la actividad de la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK II) en el hipocampo de rata (Lou y col., 1999), de forma que el tratamiento crónico altera la velocidad de síntesis y degradación de la CaMK II, disminuyendo el número de proteínas y alterando la capacidad de respuesta celular (fenómeno de *down-regulation*).

Mientras que la precipitación del síndrome de abstinencia de morfina con naloxona produce un aumento de CaMK II (*up-regulation*), en particular de la isoforma β .

Por otro lado, la inactivación de PLC bloquea la inhibición, mediada por G_i , de la actividad de la AC en células NG108-15 y SK-N-SH (*Fan y col., 1998*). En este sentido, parece ser que la presencia de Ca^{2+} /calmodulina inhibe la actividad de la AC tipo I, que es específica de neuronas, vía proteínas $G\alpha_o$ y $G\beta\gamma$ (*Tang y Gilman, 1991*). De manera que la inhibición de la actividad de PLC β conduce a una disminución en los niveles de Ca^{2+} /calmodulina y así atenúa la capacidad de los opioides para inhibir la AC por esta vía.

4.4.- Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Un gran número de procesos celulares de los GPCRs tales como el crecimiento y la diferenciación son regulados por estimulación de las cascadas de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Figura 10). Al menos existen tres vías de MAPK, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), las quinasas Jun N-terminal (JNKs), y las quinasas p38, a través de las cuales se fosforilan numerosos factores de transcripción.

En un principio, se demostró la estimulación de ERK1 y ERK2 por agonistas opioides del receptor μ en células CHO (*Li y Chang, 1996*). Esta estimulación es selectiva del ligando, dependiente de su dosis, y sensible a PTX, lo que determina la participación de las proteínas $G_{i/o}$ en esta vía. También se ha descrito una estimulación, a través de las subunidades α de las proteínas $G_{i/o}$ y $G_{q/11}$, tras la activación del receptor opioide δ (*Shahabi y col., 1999; Zhang y col., 1999*), y κ en células C6 glioma (*Bohn y col., 2000*), que implican a la PLC, PKC y Ca^{2+} intracelular.

Además, en sistemas de expresión heterólogos se ha demostrado que los tres tipos de receptores opioides son capaces de estimular la fosforilación y activación de ERK1/2, a través del complejo $G\beta\gamma$ en una manera dependiente de Ras (*Fukuda y col., 1996*). De esta forma, en la compleja red de señalización de las MAPKs, los opioides pueden modular distintas vías a través de las acciones de $G\beta\gamma$ que se liberan de las

proteínas Gi/o. Una de sus mayores posibilidades es la estimulación de la isoforma γ de la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K) (Hawes y col., 1996). Así, agonistas del receptor opioide μ , tales como el DAMGO, activan tres efectores distintos en células CHO (Polakiewicz y col., 1998): la Akt (también conocida como proteína quinasa B), una serina-treonina quinasa de la vía de PI3K (que inhibe la apoptosis en neuronas), la p70S6 quinasa y los represores de la translación del ARNm, 4E-BP1 y 4E-BP2, modulando con ello, el desarrollo neuronal y la plasticidad sináptica por regular la supervivencia de la célula y el control transcripcional.

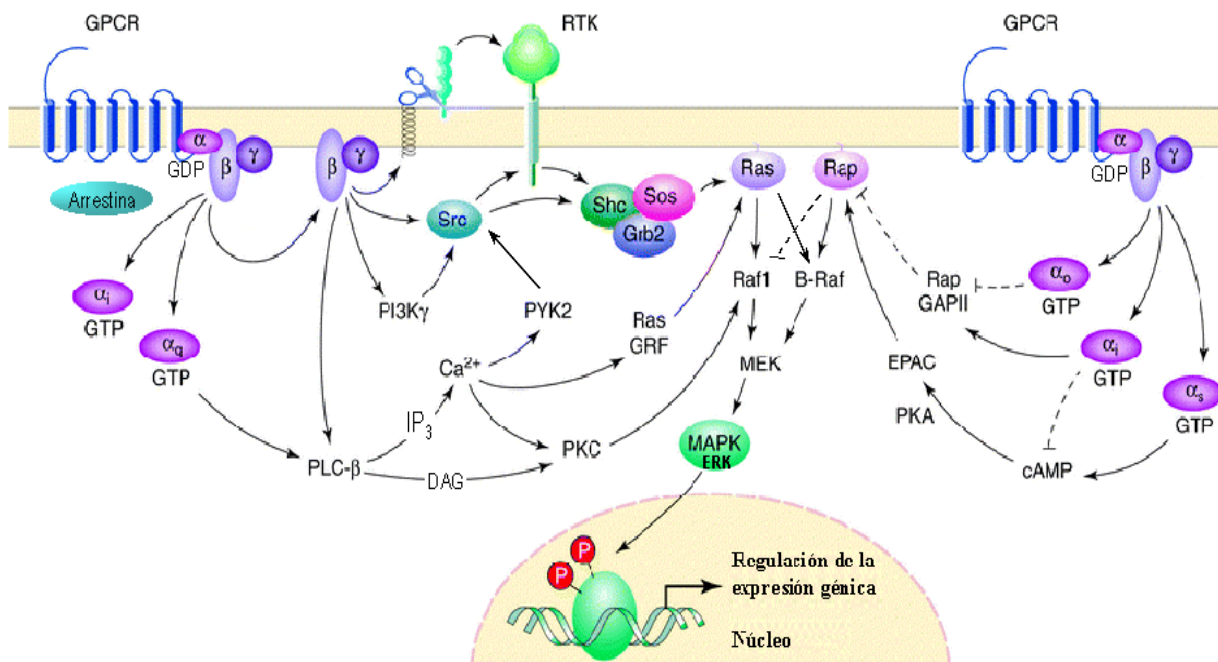


Figura 10. Regulación por GPCRs de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Las rutas bioquímicas que se inician con $\beta\gamma$ activan tirosina quinasa o receptores de tirosina quinasa, las cuales reclutan en la membrana complejos que contiene la proteína Sos, con función GEF, al promover en Ras el intercambio de GDP por GTP. Por otro lado, la $G\alpha_q$ puede estimular la Ser/Thr quinasa Raf1, a través de: la PKC; la activación dependiente de Ca^{2+} de Ras por RasGRF; o la estimulación de las tirosinas quinasa vía Sos. Asimismo, las $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ y $G\alpha_s$, a través de rutas específicas de cada tejido, regulan Rap1, la cual puede estimular B-Raf y, en último término, la MAPK (ERK). La MAPK se transloca al núcleo y fosforila proteínas nucleares y factores de transcripción, regulando así la expresión génica. Las flechas indican estimulación y las líneas discontinuas inhibición. EPAC: proteína GEF activada por AMPc; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; GAP: proteína activadora de GTPasa; GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina; GRF: factor liberador de nucleótidos de guanina, equivalente a función GEF; MEK: MAPK quinasa; PI3K: fosfoinositido-3-quinasa; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; PLC: fosfolipasa C; RTK: receptor de tirosina quinasa.

Los receptores opioides también modulan las señales generadas por los factores de crecimiento. Por ejemplo, la activación crónica de los receptores opioides μ o κ atenúa la estimulación del factor de crecimiento epidérmico sobre las ERKs (*Belcheva y col., 1998*). Además, la actividad de la tirosina quinasa parece ser inducida por el receptor opioide en células SK-N-SH (*Nakano y col., 1994*), donde una proteína de 58 kDa es fosforilada en los residuos de Tyr, seguida del tratamiento con morfina. Esta fosforilación puede ser bloqueada por tratamiento con la PTX. En fibroblastos Rat-1 que expresan el receptor opioide δ , la [D-Ala₂, D-Leu⁵] encefalina (DADLE) es capaz de estimular la fosforilación en Tyr de la proteína adaptadora p52 Shc, también en una manera sensible a PTX (*Mullaney y col., 1997*), y en función de su concentración, puede activar además las quinasas p70 y p85 S6 (*Wilson y col., 1997*).

En conjunto, la activación de la MAPK, S6 quinasa, PI3K, y proteínas Shc por los opioides supone una fuerte señal mitogénica que regula el crecimiento celular. Los receptores opioides μ y δ poseen diferentes capacidades para potenciar la proliferación celular inducida por el factor de crecimiento en varios tipos de células (*Law y col., 1997*), que se relacionan con señales mitogénicas específicas.

Aparte, la estimulación de la cascada de la MAPK por morfina, tiene efectos inmunomoduladores e inmunosupresores sobre los linfocitos humanos (*Chuang y col., 1997*), y además, está implicada en la desensibilización e internalización del receptor opioide μ (*Polakiewicz y col., 1998*). En este sentido, el tratamiento crónico con morfina disminuye su actividad en neuronas corticales (de las capas II/III), eminencia media, y núcleos hipotalámico y amigdalóide de rata (*Schultz y Hollt, 1998*). Sin embargo, en estas regiones del cerebro, el tratamiento agudo de morfina no tiene efectos sobre la actividad de las ERKs.

Recientemente se ha descrito que los GPCRs pueden estimular las ERKs a partir de complejos de adhesión focal y de procesos de desensibilización y secuestro de GPCRs (*Luttrell y col., 1999*). Así, los agonistas opioides μ activan la quinasa de adhesión focal en neuronas corticales de embrión de pollo (*Mangoura, 1997*), y aunque se ha descrito que la internalización del receptor opioide δ es requerida para la

estimulación de la MAPK (*Ignatova y col., 1999*), la internalización del receptor κ no parece ser necesaria (*Li y col., 1999; Jordan y col., 2000*).

En el caso del receptor opioide μ , la inhibición de la MEK1/2 o IP3K, en células COS-7, previene su internalización mediada por el DAMGO (*Polakiewicz y col., 1998*). En células HEK293 esta inhibición también previene la desensibilización homóloga del receptor opioide μ (fosforilación e internalización) causada por el DAMGO (*Schmidt y col., 2000*). Por otro lado, se sabe que la morfina no es capaz de inducir la internalización del receptor opioide μ , pero sin embargo, estimula la MAPK, incluso a concentraciones a las que inhibe la actividad de la AC (*Keith y col., 1996*).

En cuanto al receptor opioide κ , Jordan y colaboradores (2000), han descrito que los agonistas de este receptor (tanto peptídicos como no peptídicos) activan la MAPK en células CHO, pero sólo los agonistas peptídicos inducen la internalización del receptor. Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la internalización del κ , no es requerida para la activación de la MAPK a través de este receptor.

La participación de JNK o p38 quinasa en la señalización opioide, también ha sido descrita en varias líneas celulares. Si consideramos que los receptores opioides se acoplan a G_{16} (*Lee y col., 1996*), la cual activa a JNK (*Higashita y col., 1997*), la estimulación de esta vía es posible. Gutstein y colaboradores (1997) describieron la regulación de SAPK (JNK) en células COS-7. Por otro lado, la capacidad de la [D-Ala²] deltorfina II para aumentar la actividad del factor de transcripción NF-AT/AP-1, en células Jurkat T, sugiere que al menos el receptor opioide δ es capaz de regular JNK (*Hedin y col., 1997*).

Por último, una activación de la quinasa p38, mediada por receptores opioides δ y sensible a PKC, también ha sido descrita, hasta la fecha, en células NG 108-15 (*Zhang y col., 1999*).

5.- Mecanismos de regulación del receptor opioide.

La capacidad de regulación es algo consustancial a los sistemas de señalización, y permite a la célula adaptarse rápidamente a los cambios en su entorno y responder en cada momento a las necesidades del organismo. En este sentido, la estimulación prolongada de una célula conduce, a menudo, a una disminución en la capacidad de respuesta de dicha célula a posteriores estímulos; se trata de un fenómeno biológico general que recibe el nombre de desensibilización o tolerancia.

La actividad de los GPCRs, entre ellos los receptores opioides, es regulada de forma similar. Un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los mecanismos de regulación de esta superfamilia de proteínas son los receptores β -adrenérgicos, que se acoplan preferentemente a proteínas G transductoras tipo Gs para activar efectores de membrana plasmática, de los que la enzima adenilato ciclasa (AC) es la más conocida. En este modelo la presencia del agonista promueve una rápida desensibilización del sistema, o pérdida de respuesta, mediante el desacoplamiento de los receptores de las proteínas G y su desaparición transitoria de la membrana plasmática (taquifilaxia o tolerancia aguda). A más largo plazo, la presencia continuada del agonista da lugar a cambios en velocidades de síntesis y degradación, alterándose el número de proteínas receptoras y la capacidad de respuesta celular (tolerancia a largo plazo).

5.1.- Fosforilación del receptor y desensibilización.

La fosforilación de los receptores β -adrenérgicos parece jugar un papel determinante en la rápida desensibilización y desacoplamiento funcional de estos receptores, promovida por sus propios agonistas. Las proteína quinasas, incluyendo las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), fosforilan específicamente sólo la forma activa de los receptores (*Pei y col., 1995; Zhang y col., 1998; Lefkowitz, 1998*). La fosforilación por GRKs, impide la interacción del receptor con la proteína G (receptor desensibilizado), y permite su interacción con una proteína reguladora adicional, la arrestina, que se sigue de una internalización del receptor en vesículas de clatrina (*von Zastrow y Kobilka, 1992*). Además, la arrestina es una molécula adaptadora, en la señalización del receptor β_2 -adrenérgico, que permite la formación del

complejo receptor-quinasa Src, a través del cuál, se activan las MAP quinasas ERK1/2 (*Luttrely col., 1999*).

Recientemente, cambios en la expresión de diferentes GRKs y β -arrestina 2, han sido descritos en el S.N.C. de ratas sometidas a un tratamiento agudo o crónico con el agonista opioide sufentanilo (*Hurle, 2001*), lo que sugiere su implicación en los fenómenos de desensibilización del receptor opioide μ .

De acuerdo a este modelo, la fosforilación de los tres tipos de receptor opioide μ , δ y κ ha sido demostrada (*Pei y col., 1995; Arden y col., 1995; Appleyard y col., 1997*). Diversos estudios bioquímicos ponen de manifiesto que esta fosforilación es dependiente del agonista y se correlaciona con su eficacia (*Yu y col., 1997*). En este sentido, la subunidad catalítica de la PKA es capaz de fosforilar *in vitro* el receptor activado por morfina pero no el complejo DAMGO-receptor (*Chakrabarti y col., 1998*).

Además, los receptores opioides δ (*Pei y col., 1995*) y μ (*Zhang y col., 1996; El Kouhen y col., 1999*) son fosforilados por GRKs. Agonistas tales como DAMGO o etorfina inducen la fosforilación del receptor opioide μ . Sin embargo, los trabajos llevados a cabo con la morfina y este receptor ponen de manifiesto que la fosforilación es dependiente de la línea celular y del nivel de expresión de las diversas quinasas. De esta manera, se ha descrito su fosforilación en células CHO (*Yu y col., 1997*), pero no en HEK293 (*Arden y col., 1995; Zhang y col., 1998*). El contenido de GRK2 en las células CHO es mayor que en las HEK293, donde para obtener el mismo efecto fue necesario sobreexpresar esta quinasa. Tal observación sugiere que el complejo morfina-receptor no es un buen sustrato de GRKs (*Zhang y col., 1998*).

Por el momento, se desconocen los residuos de los receptores opioides que son fosforilados, aunque se sabe que están en el extremo carboxilo terminal (*Zhao y col., 1997; Murria y col., 1998; Law y col., 2000*). La mayoría de las proteína quinasas implicadas en la fosforilación del receptor inducida por el agonista son GRKs (*Pei y col., 1995; Zhang y col., 1998*), aunque también, participan la CaMK II (*Koch y col., 1997*).

El receptor opioide μ presenta una fosforilación basal en la que interviene la CaMK II (Wang y col., 1996; Koch y col., 1997), la cual es reclutada a la membrana por la GRK5 que se une a la calmodulina a través de su extremo amino terminal, y a la G β por el extremo carboxílico (Pronin y col., 1997).

A pesar de que no se ha descrito la fosforilación directa por MAP quinasa del receptor opioide, si se ha hecho de otros GPCRs tales como el receptor AT1 de angiotensina (Yang y col., 1997), y se relaciona a la ERK1/2 con los procesos de desensibilización del receptor μ , porque inhibidores de la MEK (MAP quinasa quinasa) o de la PI3K evitan este proceso en células CHO tratadas con DAMGO (Polakiewicz y col., 1998). Tampoco se han descrito las secuencias consenso de fosforilación por MAP quinasa en los extremos carboxilo terminales de los receptores opioides μ o κ . Sin embargo, el residuo Thr361 del receptor opioide δ es un sitio potencial de fosforilación, probablemente por ERK1/2, inducida por el agonista.

Para el receptor δ se ha descrito una correlación directa entre fosforilación y desensibilización (Hasbi y col., 1998). El inhibidor de PKA/PKC, H7 no es capaz de bloquear la desensibilización, a diferencia de los inhibidores de las GRKs, heparina y Zn²⁺. Por el contrario, no se ha demostrado esta relación con el receptor opioide μ y en el proceso de desensibilización se observa que tras su fosforilación, la arrestina no promueve su internalización (Cheng y col., 1998).

5.2.- Internalización del receptor opioide.

La internalización del receptor opioide inducida por un agonista y la disminución en el número de proteínas receptoras y, por tanto, de la capacidad de respuesta celular (*down-regulation*) fueron inicialmente demostrados en líneas celulares que expresan el receptor opioide δ (Chang y col., 1982; Cvejic y col., 1996; Law y col., 1994; Malatynska y col., 1996). Únicamente, los agonistas inducen la *down-regulation* del receptor, los agonistas parciales y los antagonistas no (Keith y col., 1996; Remmers y col., 1998). En este sentido, se ha descrito que la morfina sólo induce *down-regulation* del receptor opioide δ en presencia del μ (Baumhaker y col., 1993; Zadina y col., 1994).

La internalización del receptor opioide es dependiente del agonista y es mediada por vesículas cubiertas de clatrina. (Keith y col., 1996; Segredo y col., 1997; Ko y col., 1999). En este sentido, DAMGO y sufentanilo, pero no morfina, inducen la internalización del receptor opioide μ (Arden y col., 1995; Zhang y col., 1998; Whistler y von Zastrow, 1998; Keith y col., 1996; Díaz y col., 2000), y sólo en sistemas en los que se sobreexpresa la GRK2 (Zhang y col., 1998) o β -arrestina (Whistler y Zastrow, 1998) la morfina induce la internalización de este receptor, lo que sugiere que el complejo morfina-receptor promueve su endocitosis al aumentar la unión de la arrestina al complejo, bien por el aumento de la fosforilación del receptor o por el aumento de la concentración de la arrestina.

También, se ha descrito la *down-regulation* del receptor opioide κ tras el tratamiento con el agonista, en distintas líneas celulares (Joseph y Bidlack, 1995; Shapira y col., 1997; Zhu y col., 1998). Sin embargo, no ha podido ser demostrada la internalización del receptor opioide δ inducida por morfina (Zhang y col., 1999).

Además, existen diferencias en la regulación celular de los receptores opioides, así, la internalización inducida por el agonista es mayor para el $\delta > \kappa > \mu$. En este sentido, la etorfina induce una rápida internalización y *down-regulation* del receptor opioide δ , mientras que la internalización del receptor opioide κ expresado en la misma célula (Chu y col., 1997) o la *down-regulation* del μ (Afify y col., 1998) es más lenta. En este proceso, el extremo carboxilo terminal de estos receptores parece estar involucrado, porque quimeras de receptores μ , que contienen el extremo carboxilo terminal del receptor δ , muestran un incremento en la internalización y *down-regulation*.

6.- Antecedentes y objetivos del estudio.

Los receptores acoplados a proteínas G intervienen en las acciones de numerosas y diversas sustancias mensajeras, así como de una gran variedad de estímulos sensoriales. Estos receptores comparten un mismo modelo estructural (siete dominios transmembranales) y la capacidad de activar distintas proteínas G heterotriméricas, que se disocian en subunidades α y $\beta\gamma$; que a su vez modulan diversos efectores intracelulares, como adenilato ciclasas, fosfolipasas C tipo β , canales iónicos o el estado de activación de Ras y las vías de las quinasas mitogénicas.

La amplia participación de los receptores acoplados a proteínas G en procesos fisiológicos evidencia el interés del estudio de sus mecanismos de activación y desactivación. Una característica general de estos receptores es la existencia de complejos mecanismos que regulan su capacidad de respuesta, y que son la base de fenómenos fisiológicos muy importantes, como la integración de señales o los procesos de desensibilización o tolerancia.

En este sentido, los receptores opioides, incluidos en la familia de receptores G, median los efectos beneficiosos, en concreto la potente analgesia, e indeseables de los opioides, ya que su administración crónica produce una serie de modificaciones en el organismo que origina el desarrollo de fenómenos de dependencia y de tolerancia a la mayor parte de sus respuestas farmacológicas. Estos procesos se desarrollan como consecuencia de los cambios adaptativos a nivel celular y molecular que se producen en el sistema nervioso central por la presencia continuada del opiáceo, y que persisten durante un largo período de tiempo incluso después de la interrupción del tratamiento.

El protagonismo del receptor opioide tipo μ en la analgesia y el desarrollo de tolerancia y dependencia a morfina surge de diversos estudios *in vivo*. Resultados previos del *Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto de Neurobiología Santiago Ramón y Cajal* ponen de manifiesto que la administración de anticuerpos generados frente a secuencias extracelulares del receptor μ (Garzón y col., 1994) o de oligodeoxinucleótidos antisentido que bloquean la síntesis de este receptor (Rossi y col., 1994; Chen y col., 1995;

Sánchez-Blázquez y col., 1997) disminuye la analgesia inducida por los agonistas morfina y DAMGO en roedores. Además, la administración de estos anticuerpos y/o ODNs, previa a un tratamiento crónico con morfina, disminuye el rigor del síndrome de abstinencia precipitado en animales tolerantes (*Sánchez-Blázquez y col., 1996, 1997*). Estos estudios fueron confirmados con la utilización de ratones mutantes deficientes en los genes responsables de la expresión de cada uno de los receptores opioides μ , δ y κ , que asignan un papel clave en la analgesia y dependencia morfinica al receptor μ (*Matthes y col., 1996*).

El proceso de desensibilización se ha caracterizado principalmente a nivel del receptor, su fosforilación mediante quinasas específicas y su interacción con proteínas adaptadoras denominadas arrestinas, bloquea la transducción de la señal, y facilita la internalización del receptor (*Krupnick y col., 1998*). En los últimos años son cada vez más frecuentes los datos que indican que la pérdida de señalización de receptores G (en este caso particular los opioides) puede también producirse sin el concurso de fosforilación, internalización y reactivación (*Law y col., 2000*). Por consiguiente, el receptor constituye la puerta de entrada de las señales de los agonistas, sin embargo, los mecanismos responsables de su pérdida de eficacia y del desarrollo de taquifilaxia o tolerancia pueden implicar también mecanismos postreceptor en el entorno de las proteínas G.

A nivel del receptor opioide, numerosas evidencias revelan que su fosforilación por proteína quinasas, entre ellas las GRKs (de *G protein-coupled receptor kinases*), que fosforilan el receptor de forma dependiente de agonista (*Pei y col., 1995; Zhang y col., 1998*), y la proteína quinasa C (PKC) (*Gucker y Bidlack, 1992; Ueda y col., 1995; L. Zhang y col., 1996*), son claves en los mecanismos de desensibilización e internalización de este receptor. Así, en sistemas de células en cultivo en los que se co-expresan los diferentes componentes de la maquinaria de transducción, se ha observado que la estimulación de la enzima quinasa proteica C por distintos agentes, aumenta la desensibilización del receptor μ , que se revierte al elevar los niveles intracelulares de AMPc, a través de la proteína quinasa A (*Zhang y col., 1996*). Por el contrario, a nivel del sistema nervioso central la información es considerablemente más escasa, aunque se sabe

que el inhibidor de PKC -H7-, reduce el síndrome de abstinencia en ratones tolerantes-dependientes a una dosis única de morfina (Bilsky y col., 1996).

En esta misma línea la administración *in vivo* de anticuerpos generados frente a secuencias específicas de las subunidades α (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , $\alpha_{x/z}$) a ratones tolerantes-dependientes a la morfina es capaz de reducir de forma significativa la severidad del síndrome de abstinencia (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1994), reforzando la propuesta de participación de las proteínas G en los mecanismos responsables de la pérdida de eficacia de los agonistas opioides en los procesos de desensibilización del receptor. Además, el bloqueo de su función por la fosforilación de G_z y la acetilación de G_s es un mecanismo de regulación del receptor (Wedegaertner y Bourne, 1994; Fields y Casey, 1995). La misristoilación y/o palmitoilación reversible de las subunidades $G\alpha$ condiciona su interacción con la membrana plasmática y con otras proteínas, bien sean receptores o efectores (Mumby, 1997; Wedegaertner, 1998).

Los estudios realizados sobre cerebros de ratas tolerantes a la morfina han puesto de manifiesto cambios en los niveles de algunos subtipos de proteínas G, sin embargo, estos cambios no se corresponden con modificaciones similares de los ARN mensajeros que codifican estas proteínas (Basheer y Tempel, 1993), las cuales son moléculas muy estables con una vida media larga. Por consiguiente, ninguno de los mecanismos reguladores descritos anteriormente explican la rápida recuperación de la señalización mediada por las proteínas G. Probablemente, esta recuperación se deba a un aumento en la velocidad de hidrólisis del GTP, que devuelve a la $G\alpha$ a su estado de unión con $G\beta\gamma$ y acoplamiento a receptores. Este mecanismo es una de las funciones de la familia de proteínas conocidas como reguladores de la señalización de las proteínas G (RGS de *Regulators of G-protein Signalling*) (Gold y col., 1997). Sin embargo, las proteínas RGS al unirse a las subunidades α activas ($G\alpha$ -GTP) inhiben la interacción efectiva entre estas y los correspondientes sistemas efectores. Así, ciertas RGS han sido propuestas como reguladores negativos en la señalización de los receptores acoplados a proteínas G (Hepler, 1999).

Otra proteína como la fosducina participa también en este complejo entramado regulatorio, que es parte integral de los sistemas de transducción. La fosducina es una proteína citosólica (presente en altas cantidades en la retina) y que tras unirse con gran afinidad al complejo $G\beta\gamma$, que se libera tras la disociación de las $G\alpha$ -GTP activadas por agonista-receptor, bloquea la activación de efectores inducida por la estimulación de las proteínas G (Gaudet y col., 1999). Se ha propuesto la existencia de unas proteínas de estructura y función homólogas (Schröder y Lohse, 1996), conocidas como tipo fosducina (PhLP), que se expresarían en cerebro y otros tejidos (Miles y col., 1993). El papel de todas estas proteínas reguladoras en la modulación de los receptores G está orientado a limitar la duración e intensidad de la señal inducida por las proteínas G, y sugiere que cambios en su expresión o función alteren la eficacia de la señalización intercelular y tengan consecuencias fisiopatológicas.

Por otro lado, la investigación más reciente llevada a cabo en nuestro laboratorio, demuestra que tras su administración *in vivo*, las proteínas $G\alpha$ misristoiladas son capaces de incorporarse funcionalmente a la regulación de receptores (Garzón y col., 1999). En este sentido, la administración de $G\alpha_{i2}$ tras la reducción de la analgesia opioide por tratamiento con toxina pertúsica, que inactiva proteínas G_i/G_o , produce una recuperación del efecto. También demuestran que la administración de subunidades α de las proteínas G_{i2} previene o revierte en su caso la aparición de taquifilaxia o tolerancia aguda opioide (Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001), por lo que suponen una nueva herramienta, que sirve para discriminar disfunciones causadas por alteraciones en la transducción, de aquellas debidas a perturbaciones a nivel del receptor de membrana.

De esta forma se plantea la posibilidad de restaurar farmacológicamente la calidad de los efectos mediados por receptores G, cuando la transducción asociada sufre ciertas alteraciones funcionales y se propone que en la génesis de la taquifilaxia, tolerancia/dependencia opioide y posiblemente de las alteraciones morfológicas observadas tras el uso crónico de opioides se encuentran alteraciones en la transducción receptorial.

En base a lo mencionado, en este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Determinación del efecto de la administración crónica de morfina sobre los niveles de diferentes PKCs y de un tipo de proteína de anclaje específica de las mismas, la RACK-1, en la corteza cerebral del ratón, así como la evaluación de los posibles cambios durante la abstinencia hasta la recuperación de la respuesta normal a los opiáceos.
2. Establecer la importancia de las proteínas reguladoras de las proteínas G (RGS) en la respuesta analgésica mediada por un receptor G, el receptor opioide μ . Se procederá a reducir la expresión de diferentes subtipos de RGS que se expresan en S.N.C. de ratón (RGS2, RGS3, RGS4, RGS7, RGS9, RGS12, RGS14 y RGS16), mediante la administración subcrónica de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs). Tras comprobar la eficacia del tratamiento con los ODNs para reducir los niveles de la proteína diana, determinaremos el papel de ciertas RGS (RGS2 y RGS9-2) en los mecanismos moleculares que originan la pérdida de eficacia analgésica del opioide morfina (taquifilaxia y tolerancia a largo plazo).
3. Determinación de la presencia y distribución de las proteínas tipo fosducina isoforma larga (PhLP_L), en el cerebro de ratón. Después de evaluar su papel funcional en el efecto antinociceptivo mediado por el receptor opioide μ en el ratón, con la administración de ODN, se estudiarán los posibles mecanismos que regulan su función y se analizará su participación en los efectos agudos y crónicos de la morfina sobre este receptor.
4. Realizar ensayos *in vitro* de la funcionalidad, a nivel molecular, de la actividad GTPasa de las proteínas G que tras ser administradas *in vivo* son capaces de incorporarse funcionalmente a la cascada de señalización iniciada por el receptor.
5. Análisis del mecanismo y/o el lugar preciso de la superficie de la membrana celular, implicados en el reconocimiento e internalización de las proteínas G α tras ser administradas *in vivo*, empleando para ello el modelo de astrocitos en cultivo.

Materiales y Métodos

1.- Materiales

1.1.- Animales.

Se utilizaron ratones macho, variedad albina, cepa CD-1 (*Charles River*, Barcelona), de 22-27 g de peso y ratas variedad albina, raza Wistar, procedentes del animalario del Instituto Cajal. Para generar anticuerpos policlonales se utilizaron conejos, raza New Zealand White (*Biocentre*, Barcelona). Todos los animales se mantuvieron en el estabulario en condiciones de agua y comida *ad libitum*, periodos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura ambiente de 22°C.

En la estabulación y utilización de los animales se siguió la normativa vigente de la Unión Europea sobre uso y experimentación con animales de laboratorio.

1.2.-Cultivos celulares.

Los cultivos primarios de astrocitos empleados en parte de los estudios fueron preparados directamente a partir de la corteza cerebral de rata, mostrando propiedades diferenciadas típicas de sus orígenes, que les hacen accesibles al estudio a través de sistemas y técnicas que no se pueden aplicar en los tejidos intactos. El primer paso del aislamiento de los astrocitos a partir del tejido neonatal consiste en romper la matriz extracelular y las uniones intercelulares que mantienen unidas entre sí las células. Los cerebros de rata neonatal (P0-P1) se obtuvieron por decapitación y disección, separándose las meninges de los hemisferios cerebrales. Las cortezas libres de meninges se lavan con BME (EAGLE) suplementado con Glutamax, penicilina (20 IU/mL), estreptomycin (20 µg/mL), 33 mM de glucosa y suero fetal bovino al 10% (BME/F-10S) que contiene moléculas proteicas extracelulares esenciales para la supervivencia, desarrollo y proliferación celular; disgregándose el tejido por acción mecánica con una pipeta y su paso a través de un filtro estéril de 135 µm. Tras su centrifugación a 700 xg, se recoge el sedimento que se resuspende en BME/F-10S, realizándose un segundo filtrado a través de un poro de 20 µm, separándose así vasos sanguíneos y agregados celulares que interfieren en la obtención de un cultivo puro. La suspensión celular de

corteza se sembró en frascos de cultivo creciéndose en un incubador a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂ saturada de vapor de agua. La multiplicación de estas células es inhibida cuando establecen contacto entre sí, lo que permite la formación de una monocapa confluyente a los 8-10 días, en la cual cada célula se adhiere a la superficie de crecimiento y contacta con las células vecinas a todo su alrededor. Adicionalmente, los astrocitos se purifican según la tendencia de las células a adherirse fuertemente a esta superficie. Así, mediante agitación orbital durante 12 horas a 37°C se separan las células de precursores 0-2A y, parcialmente la microglia que se adhieren menos fuerte.

El desprendimiento de los astrocitos para transferirlos a otras superficies se realizó con el agente proteolítico tripsina y con el EDTA (etilendiamín tetraacético) que une el Ca²⁺ del que depende la adhesión célula-célula, pudiendo formar cultivos secundarios sobre cubres redondos de cristal o placas de plástico previamente tratados con poli-L lisina (2,5µg/mL) que les confiere carga positiva necesaria para la adhesión de los astrocitos.

1.3.- Anticuerpos y proteínas recombinantes empleados en este estudio.

En los estudios bioquímicos se emplearon anticuerpos generados y caracterizados en el laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal, dirigidos a la secuencia peptídica específica EEQGMLPEDLS, fragmento 115-125 de la proteína Gα_{i2} (Sánchez-Blázquez y col., 1993; Garzón y col., 1994; 1997) y frente a una secuencia común a la fosducina (Phd, fragmento 21-34) y proteína tipo fosducina isoforma larga (PhLP_L, fragmento 58-70), GPKG_{VINDWRKFK} (presente trabajo). Los anticuerpos específicos de RGS9 y RGS2 fueron adquiridos a *Santa Cruz*, y los anticuerpos policlonales de caveolina y Gβ₅ a *Transduction Laboratory* y *Chemicon*, respectivamente.

La Gα_{i2} recombinante empleada en el estudio fue obtenida de *Calbiochem*, o generada en el laboratorio con el sistema de expresión pPROEX™ de *Life Technologie*, y la PhLP_L con el vector pGEX-2T de *Amhersam Pharmacia*, tal y como se describe posteriormente. La Phd recombinante fue cedida por el Prof. Dr. R. Schulz (Instituto de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Munich), o adquirida de *Calbiochem*.

1.4.- Obtención y caracterización de anticuerpos anti-Phd/PhLP_L.

Como se ha mencionado anteriormente, se generó un anticuerpo policlonal frente a una secuencia aminoacídica, seleccionada como péptido antigénico, común a la fosducina (Phd) y PhLP_L: H-GPKGVINdWRKFK-OH; tras realizar un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas deducida a partir del ADNc de ratón (*Groshan y col., 1993; Abe y col., 1993*), y que corresponde a los aminoácidos del 21 al 34 de la Phd o 58 al 70 de la PhLP_L (*Craft y col., 1998*).

1.4.1.- Acoplamiento del péptido antigénico al toxoide diftérico.

El sistema inmune reacciona más vigorosamente si la molécula tiene un alto peso molecular. Para aumentarlo, se conjugó o unió químicamente el péptido antigénico, que se sintetizó con un residuo adicional de cisteína en el extremo amino terminal, a una molécula de mayor tamaño que hace las veces de un presentador o transportador, en nuestro caso el toxoide diftérico, acoplándose mediante el éster Maleimidocaproyl-N-Hidroxisuccinimida (MCS) que une el grupo SH- de la cisteína y grupos amino libres (*Chiron Technologies*).

Se forma, de este modo, un complejo covalente péptido/transportador que puede contener varias moléculas de péptido por molécula de presentador, con la consecuente posibilidad de estimular repetidamente al sistema inmune con una cantidad pequeña del complejo antigénico.

1.4.2.- Inmunización de los animales.

Se emplearon conejos, a los que se les puede sangrar varias veces, con una obtención de alrededor de 15-20 mL de suero y la sangría final puede proporcionar entre 30-40 mL de suero de alto título.

En nuestro caso, el péptido acoplado al toxoide diftérico se inyectó a los conejos junto con un adyuvante para incrementar aún más la respuesta inmunológica. Se utilizó el adyuvante completo de Freund, constituido por un aceite mineral que contiene una pequeña cantidad de bacterias *Mycobacterium butyricum* inactivadas, o incompleto (sin micobacterias) según la fase del proceso de inmunización.

El antígeno a una concentración de 0,5 mg/mL en un tampón acuoso, se mezcló vigorosamente a una relación 1:1 con el adyuvante completo de Freund, formando una emulsión estable. Aproximadamente, 0,5 mL fueron inyectados por vía intramuscular, en cada una de las extremidades posteriores del conejo. A las dos semanas se realizó la primera inyección de refuerzo por vía subcutánea, empleándose el péptido, esta vez con el adyuvante incompleto.

A partir de este momento fue necesario seguir el curso de la aparición del anticuerpo en la circulación sanguínea. Para ello esperamos tres semanas para realizar una sangría de control en el animal. Repitiéndose (aproximadamente una cada mes) hasta que se observó una pérdida de titulación de los sueros.

1.4.3.- Obtención y preservación del suero.

La sangre extraída se dejó coagular a temperatura ambiente durante 3-4 horas, tras lo que se centrifugó a 1000 xg 10 minutos, para eliminar células sanguíneas y se decantó el suero, que se almacenó hasta el momento de su utilización.

1.4.4.- Caracterización y titulación de los sueros.

La caracterización de la reacción antígeno/anticuerpo se hizo por inmunodetección (*Western blotting*) que permitió visualizar la especificidad sobre membranas P₂ de distintas áreas cerebrales de ratón, al transferir eléctricamente las proteínas de la muestra, previamente sometida a electroforesis en geles de poliacrilamida/dodecilsulfato sódico (SDS/PAGE), a membranas capaces de retener proteínas. Estas se hicieron reaccionar con el anticuerpo primario (suero), visualizándose una banda proteica en el peso molecular esperado.

Para obtener un título alto del suero purificamos las IgG y realizamos las diluciones necesarias, intentando alcanzar con ellas una dilución compatible con una buena reacción del anticuerpo primario específico.

1.4.5.- Purificación de la IgG específica.

Para purificar las IgGs que se emplearon en la mayoría de los experimentos, a partir de sueros inmunes, se prepararon columnas de afinidad que contenían el péptido antigénico, que se empleó para inmunizar, acoplado químicamente a una matriz de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (CNBr) que se une covalentemente a pH 8-9 con grupos amino libres de la proteína (*AmershamPharmacia*). El suero completo se pasó por la columna de antígeno, el cual capta todos los anticuerpos presentes contra ese antígeno. La columna se lava extensivamente y se procede a eluir el anticuerpo disociando el complejo antígeno-anticuerpo con una solución de pH ácido (glicina 200 mM, pH 2,5). El eluido de IgGs fue sometido a diálisis/concentración en un sistema Micro-ProDiCom (*Spectrum*), para retención de moléculas con pesos moleculares superiores a 15,000 Da. La concentración final de proteína osciló entre 1,5 y 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

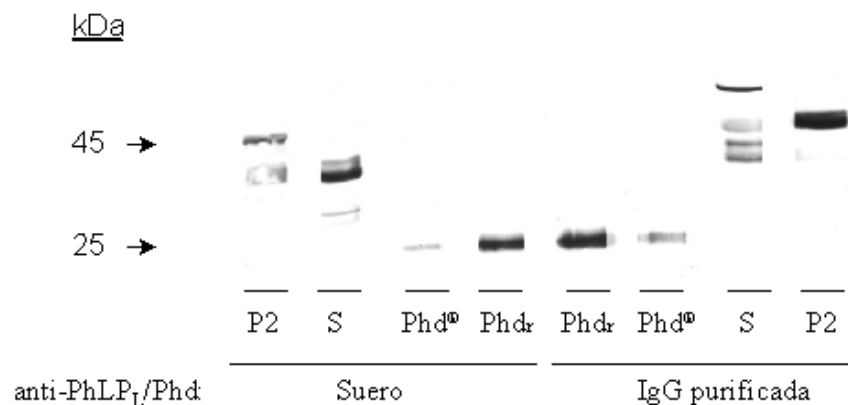


Figura 11. Comparación de la inmunoseñal obtenida con el antisuero (1:1000) y la IgG purificada (1:3000) de la Phd recombinante adquirida a *Calbiochem* (Phd[®]), de la Phd recombinante cedida por el Dr Schulz (Phd), y la PhLP_L presente en la corteza cerebral de ratón (S=citosol, P2=membranas plasmáticas).

1.4.6.- Caracterización y titulación de la IgG.

Se procedió a la caracterización y titulación de la IgG de la misma manera que se hizo para el suero, pudiendo comprobarse por inmunodetección de muestras de

membranas P₂ de distintas áreas cerebrales de ratón, que se eliminaron las reacciones de fondo debidas a contaminantes.

Posteriormente, para descartar una reactividad cruzada, y asegurar que el anticuerpo a usar sólo reconoce específicamente el antígeno deseado, realizamos un control de preabsorción. Para ello, se tuvo en cuenta la dilución óptima del anticuerpo (1:3000) que se estableció previamente, y se incubó 3 horas a temperatura ambiente y en agitación con el péptido antigénico en una cantidad lo suficientemente alta que aseguró una preabsorción completa cuando esta IgG se utilizó para inmunodetectar la PhLP_L, que se sabe, está presente en membranas P₂ de la corteza cerebral de ratón (Figura 12).

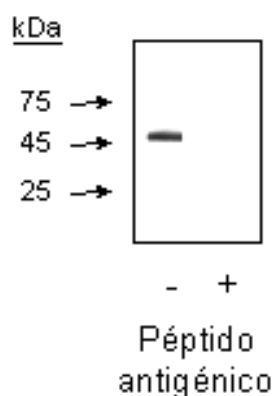


Figura 12. Preabsorción del péptido antigénico. Inmunodetección, con la IgG purificada anti-Phd/PhLP_L, de (-) 45 µg de membranas P₂ de corteza cerebral de ratón, previamente incubada sin el péptido antigénico, o de (+) 45 µg de membranas P₂ de corteza cerebral de ratón, incubada en las mismas condiciones que el control (-) en presencia de 0,4 mg del péptido antigénico.

1.5.- Purificación de PhLP_L a partir de cerebro de ratón.

En la obtención de la proteína a partir de cerebro de ratón se han conjugado varios procesos cromatográficos para enriquecer en la muestra la PhLP_L a base de que, tras cada paso de purificación, disminuíamos drásticamente la concentración de otras moléculas y sin afectar a la proteína a purificar.

De esta manera, tras comprobar que la PhLP_L es una proteína glicosilada (apartado X de Resultados), se enriqueció la muestra, membranas P₂ de corteza cerebral

de ratón, en proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad en columna de lectina de germen de trigo (*wheat germ lectin*, WGL), para posteriormente purificar la PhLP_L por inmunodetección con el anticuerpo específico acoplado a una matriz inerte (*Affi-Gel[®] Hz Hydrazide*, BioRad). La IgG purificada se obtuvo como se ha descrito anteriormente.

1.5.1.- Cromatografía de afinidad en columna de germen de trigo.

La columna de lectina de germen de trigo (*wheat germ lectin*, WGL) sobre matriz de agarosa (*Sepharose 4B*, AmershamPharmacia) es capaz de retener glicoproteínas, previamente solubilizadas con detergentes, conteniendo residuos α -D-glucosapiranosilo, α -D-mannopiranosilo u otros estéricamente semejantes.

La resina se empaquetó en una columna (*Flex-column*, Kontes) que fue preequilibrada con tampón TEL (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EGTA 1 mM, leupeptina 10 μ M), conteniendo NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, Triton X-100 1% a 4°C.

Se trabajó con tejido obtenido a partir de cerebro de ratón y se prepararon las membranas P₂ como se describe posteriormente en el apartado X de métodos, que fueron solubilizadas en tampón TEL, conteniendo NaCl 150 mM, PMSF 10 μ M, inhibidor de tripsina de soja 19 μ g/mL, bacitracina 50 μ g/mL y Triton X-100 2%, 16 horas en agitación, a 4°C. Tras una centrifugación a 100,000 x g durante 1 hora, obtuvimos el material solubilizado (el sobrenadante) que se filtró (*SterivexTM-GV 0.22 μ m*, Millipore), antes de pasarlo, durante 10 ciclos, por la columna de afinidad de lectina de germen de trigo.

Las proteínas no unidas a la columna se eliminaron mediante lavado con tampón de equilibrado. La elución se realizó con N-acetil-D-glucosamina 0,25 M, que compite con la proteína ligada por los sitios de unión de la lectina. El contenido en proteína del eluido se determinó por el método de Lowry (*Lowry y col., 1951*), previa precipitación de la proteína con ácido tricloracético, y se congeló a -70°C hasta el momento de ser empleado en ensayos posteriores.

Finalizada la elución, la columna se regeneró haciendo pasar alternativamente 2-3 volúmenes de un tampón básico (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, NaCl 0,5 M) y un tampón ácido (acetato sódico 0,1 M, pH 5,0, NaCl 0,5 M), ciclo que se repitió tres veces. La columna se conservó a 4°C en tampón acetato 0,1 M, pH 6,0, NaCl 0,9%, CaCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM.

1.5.2.- Cromatografía de afinidad mediante anticuerpo acoplado a agarosa.

En un segundo paso la muestra enriquecida en proteínas glicosiladas se hizo pasar por una columna de IgGs purificadas acopladas a un soporte de agarosa (*Affi-Gel[®] Hz Hydrazide, BioRad*), que reacciona con los grupos aldehídos de los carbohidratos oxidados de los anticuerpos, para formar un enlace covalente. Esta técnica permite una orientación uniforme y óptima de las IgGs acopladas, que facilita la exposición al antígeno de los sitios de unión al anticuerpo.

La PhLP_L glicosilada permaneció unida a la columna, y las proteínas que no se unieron fueron eliminadas mediante lavado. La elución se hizo con un tampón glicina 200 mM, pH 2,5 capaz de disociar la unión antígeno-anticuerpo.

Así, la PhLP_L obtenida a partir del cerebro de ratón, se concentró con el sistema *Ultrafree-MC 10,000 NMWL (Millipore)* que retiene las proteínas de peso molecular inferior a 10 kDa, permitiendo el intercambio del medio por un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

El posterior análisis por SDS/PAGE, confirmó mediante una tinción de plata (*Silver Stain Plus, BioRad*) la existencia de una banda de 43 kDa correspondiente a la PhLP_L purificada, que fue electroeluida para eliminar otras proteínas que acompañaban a la PhLP_L.

1.6.- Obtención de proteínas recombinantes.

El vector de expresión de procariontes pGEX-2T (*AmershamPharmacia*) con el ADNc de la PhLP_L de rata clonado entre los sitios BamHI y EcoRI, y el vector para eucariotas pcDNA3.1/Zeo (-) (*Invitrogen*) con el ADNc de la Gα_{i2} de rata entre HindIII

y NotI, fueron cedidos por el Dr A. García-España (Departamento de Patología de la Universidad de Medicina, Nueva York). Estos vectores son sistemas que ayudan en el proceso de transferencia de un gen exógeno a una célula, facilitando su entrada y biodisponibilidad intracelular, de tal modo que este pueda funcionar correctamente.

El sistema de expresión utilizado para la obtención de ambas proteínas fue *E. coli*, de forma, que fue necesario subclonar el ADNc de la $G\alpha_{i2}$ en un vector de expresión bacteriano, como el pPROEX™ (*Life Technologie*), que incorpora una cola de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína que presenta afinidad por los iones Ni^{2+} , los cuales son inmovilizados por moléculas de ácido nitrilotriacético anclados a una matriz de sefarosa CL-6B (Ni^{2+} -NTA; *QIAGEN*), facilitando su detección y/o purificación por cromatografía de afinidad.

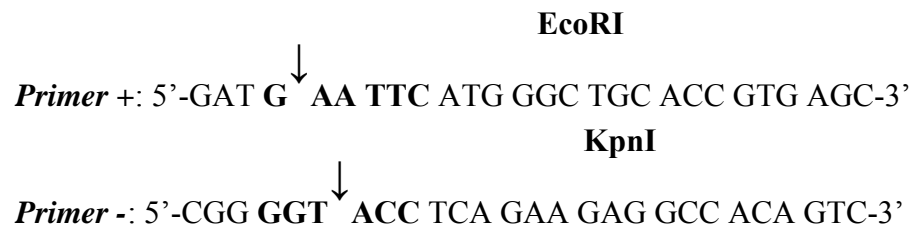
De la misma forma, el vector pGEX-2T incorpora una proteína marcadora en el extremo amino terminal de la proteína PhLP_L, la glutation-S-transferasa (GST), con alta afinidad por la glutation, que facilita su detección y/o purificación..

1.6.1.- Clonaje.

El subclonaje de la $G\alpha_{i2}$ consistió en extraer la secuencia de ADNc que la codifica del pcDNA3.1/Zeo (-), y su fusión en el MCS (*multiple cloning site*) del pPROEX™, para lo que fue necesario:

- **La preparación del inserto: obtención del ADNc de la $G\alpha_{i2}$ usando sitios de restricción nuevos.**

Diseñamos unos oligonucleótidos + y - (*primers* + y -) que flanqueaban la zona de nuestra proteína, y que poseían los sitios de restricción adecuados (EcoRI y KpnI) en sus extremos 5' y 3', para su posterior clonaje en el pPROEX™. A estos oligonucleótidos se añadieron tres bases en los extremos de los sitios de restricción para facilitar la digestión posterior, de forma que el oligonucleótido + mantuvo la pauta de lectura con el gen de fusión que codifica la cola de 6 histidinas:



Con una reacción de PCR (*polimerasa chain reaction*) utilizando los *primers* (+ y -) y una muestra del pcDNA3.1/Zeo (-) que contenía el ADNc de la secuencia de nuestra proteína, amplificamos el gen de interés. La polimerasa empleada fue la *PLATINUM⁷ Pfx* (*Life Technologie*), con actividad exonucleasa 3'→5' correctora. Esta enzima genera fragmentos de PCR con extremos romos, de manera que el ADNc amplificado se analizó por electroforesis en un gel de 1% de agarosa con bromuro de etidio (colorante que se fija al ADN y es fluorescente al iluminarlo con radiación ultravioleta).

La electroforesis se llevo a cabo en tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, 1mM EDTA pH 7,6), para comprobar con fragmentos de ADN de tamaño conocido (*1 kb Plus DNA Ladder; Life Technologie*), que el tamaño de la banda era el esperado (1700 bp).

Posteriormente, se procedió a cortar la banda y purificar el ADNc con un sistema de extracción *QIAquickTM Gel Extraction (QIAGEN)* basado en una resina de intercambio iónico.

El ADNc, así purificado, se digirió secuencialmente con las enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI*, para obtener extremos cohesivos. De nuevo, el producto de la digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, procediéndose a purificar la banda del inserto que pudo ser directamente ligado al vector.

- **La preparación del vector.**

Considerando que todos los fragmentos de ADN que corte la misma enzima de restricción tendrán los mismos extremos complementarios, que permiten unirlos entre

sí, hemos linearizado el pPROEX™ (1 µg) con KpnI y EcoRI, siendo purificado tras electroforesis en gel de agarosa al 1% con el *QIAquick™ Gel Extraction (QIAGEN)*, para asegurar una transformación eficiente.

- **Ligación.**

La mezcla del inserto de ADNc que codifica la $G\alpha_{i2}$ y el pPROEX™ linearizado, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción, tienden a unirse porque los extremos cohesivos tienen secuencias complementarias y pueden aparear sus bases. Así, se crearon moléculas de plásmido que contenían el ADNc de la $G\alpha_{i2}$, cuando se incubaron en la misma mezcla de reacción 24 horas a 14°C en presencia de la T4 ADN ligasa (*Fermentas*), que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre ambas moléculas.

1.6.2.- Expresión.

Debido a la facilidad que presenta, así como a su alto rendimiento, hemos empleado el sistema de expresión en *E. coli*. La expresión de la PhLP_L a partir del plásmido pGEX y la de la $G\alpha_{i2}$ del plásmido pPROEX™ están bajo el control de un promotor *tac* o *pTrc*, respectivamente, y un operador *lac I^q* que proporcionan altos niveles de expresión químicamente inducibles por un análogo no metabolizable de la lactosa, el IPTG (isopropil β-D-tiogalactosido).

La construcción pGEX-2T-PhLP_L o la mezcla completa de ligación, con los plásmidos que contenían el fragmento de ADNc que codifica la síntesis de la $G\alpha_{i2}$ fueron transformados en una cepa de bacterias competentes BL21/(DE3) (*Invitrogen*), que crecen en colonias bacterianas. Estas bacterias no existen competentes de forma natural, de manera que fueron obtenidas por tratamiento con soluciones de CaCl₂ en frío. Después, fueron mezcladas con el ADN plasmídico, sometiéndolas a un ligero choque térmico y permitiendo su recuperación.

Los vectores pGEX-2T y pPROEX™ contienen un gen *amp^r*, que confiere resistencia a ampicilina, por lo que sólo las bacterias que lo portan pueden crecer en

presencia de este antibiótico. Así, su siembra en placas de agar con ampicilina (100 µg/mL) permitió su selección directa.

Para identificar las colonias capaces de producir la proteína de interés, colocamos sobre las colonias un filtro de nitrocelulosa de 0,2 µm que se ajustaba al interior de la placa; tanto el filtro como la placa se marcaron apropiadamente para permitir la comparación posterior y se retiró el filtro, de forma que quedaron adheridos algunos miembros de cada colonia bacteriana. En estas colonias adheridas, conocidas como *replicas* se indujo la expresión con IPTG 30 µM (*AmershamPharmacia*) durante 3 horas. Las bacterias fueron lisadas con un detergente fuerte, el SDS (*sodium dodecyl sulfato*), que liberó las proteínas, las cuales permanecieron adsorbidas al filtro de nitrocelulosa. A continuación, las proteínas se desnaturalizaron con una solución alcalina. En seguida, se lavó el filtro con una solución de neutralización, para posteriormente, tratarla con un amortiguador que contenía el anticuerpo específico (anti-Phd/PhLP_L o anti-Gα_{i2}) capaz de reconocer a la proteína de interés. La detección se hizo con un anticuerpo secundario de cabra tipo anti-inmunoglobulina de conejo, acoplado al enzima peroxidasa y el revelado con el sustrato 3,3'-diaminobencidina, tal y como se describe posteriormente en el apartado 2.2.2 de esta sección.

El filtro se secó, pudiendo compararse la imagen con la placa original. De manera que seleccionamos las colonias que expresaban la proteína de interés, las cuales se hicieron crecer más en medio líquido.

Su expresión se indujo con IPTG, poco antes de recolectar las bacterias, para su purificación, con el fin de evitar que la elevada síntesis de la proteína extraña interfiriera con el crecimiento de la bacteria transformada.

1.6.3.- Purificación.

Debido a que la proteína deseada se produce en el interior de la bacteria, ha de purificarse del resto de las proteínas de la misma mediante cromatografía, tras su lisis con lisozima a una concentración final de 0,2 mg/mL y sonicación. El material insoluble se elimina por centrifugación a 100,000 x g en un rotor vTi45 Beckman a 4°C.

1.6.3.1.- Purificación de la proteína de fusión GST-PhLP_L.

La transformación de bacterias con el vector de expresión pGEX-2T-PhLP_L permitió producir la proteína de fusión GST-PhLP_L, en cantidad suficiente. La incorporación de la GST (glutathione **S**-transferasa) como marca facilitó su detección y/o purificación. Tras la inducción con 0,1 mM de IPTG durante 3 horas a 37°C, las bacterias fueron solubilizadas por el método del sarkosil (*Frangioni y Neel, 1993*).

La GST es una proteína de 26 kDa y un pI 5,0, aislada y clonada del nematodo *Schistosoma japonicum*, con una afinidad alta por el glutathione reducido, lo que permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad con glutathione-sefariosa (*AmhersamPharmacia*). Las proteínas así purificadas fueron en algunos casos eluidas en condiciones suaves (10 mM glutathione), lo que preservó su estructura nativa y su actividad biológica.

Para eliminar otras proteínas que acompañaban a la GST-PhLP_L eluida de la columna, se sometió a este material a una electroforesis SDS/PAGE, en condiciones no desnaturizantes, y posterior electroelución de la banda correspondiente a la GST-PhLP_L, identificada tras teñir el gel con cobre (*BioRad*).

- **Digestión de GST-PhLP_L con trombina.**

La incorporación en el vector de expresión, a continuación del GST, de una secuencia sustrato de la trombina, permitió, tras una incubación de 16 horas a temperatura ambiente de la GST-PhLP_L, anclada a la glutathione-sefariosa, con esta proteasa biotinilada (*Novagen*), obtener la PhLP_L sin GST. Se siguió de una centrifugación para eliminar la GST-glutathione-sefariosa y una purificación con streptavidina-agarosa para eliminar la trombina. La detección de la proteína de fusión se hizo mediante electroforesis SDS/PAGE y tinción con nitrato de plata (*BioRad*).

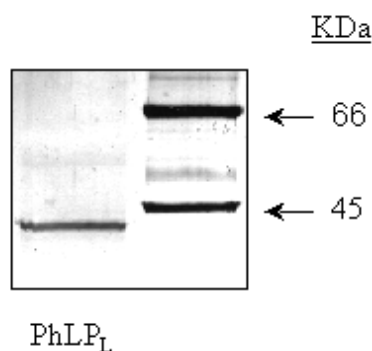


Figura 13. Tinción con plata de la PhLP_L recombinante obtenida a partir de *E. Coli*, sometida a cromatografía en columna de glutation-sefarosa y digestión con trombina. En la segunda calle se muestran las proteínas estándar de peso molecular conocido (*BioRad*).

1.6.3.2.- Purificación de la proteína de fusión 6XHis-G α_{i2} .

De forma similar, a partir del vector de expresión pPROEXTM-G α_{i2} , se incorporó una marca de 6 histidinas al extremo N-terminal de la G α_{i2} , con alta afinidad por iones Ni²⁺. Las ventajas de este sistema de purificación son varias, entre ellas, que la cola de histidinas es una marca pequeña, de manera que no fue necesaria su eliminación por proteasas al no interferir con la estructura y función de la proteína.

Las histidinas de la marca interaccionaron con el Ni²⁺ anclado a una matriz de agarosa a partir del NTA (*nitrilotriacetic acid*) lo que retuvo a las proteínas, que se eluyeron en condiciones suave (100 mM imidazol) sin afectar a la estructura de la G α_{i2} .

Para prevenir la purificación con otras proteínas que podían formar puentes disulfuro con la proteína de interés se incluyó en los medios de lisis y de lavado β -mercaptoetanol (5 mM).

Además, el material eluido de la columna de Ni²⁺-NTA se sometió a electroforesis SDS/PAGE en condiciones no desnaturizantes con el fin de preservar la estructura proteica que asegure la funcionalidad de la proteína, para posteriormente electroeluir la banda correspondiente a la 6XHis-G α_{i2} , identificada tras teñir el gel con cobre (*BioRad*).

1.7.- Marcaje con fluorescencia de proteínas $G\alpha_{i2}$ recombinantes.

Las proteínas $G\alpha_{i2}$ miristoiladas, previamente purificadas, fueron unidas a una molécula fluorescente fotoactivable, que nos permitió su localización en la célula mediante microscopía confocal. De esta manera, los grupos amino libres de las proteínas se hicieron reaccionar con el grupo N-succinimida de la 5(6)-carboxifluoresceína, capaz de emitir fluorescencia, (FLUOS, *Boehringer Mannheim*), formando enlaces amida altamente estables.

El protocolo de marcaje se inició con la incubación en solución salina de la proteína $G\alpha_{i2}$ y las moléculas de FLUOS, en proporción 1:10, durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, las proteínas marcadas fueron separadas del FLUOS no unido, mediante cromatografía de filtración en gel con columnas de Sephadex™ G-25M (*AmershamPharmacia*) que separan proteínas en función de su tamaño. La matriz de estas columnas es inerte pero porosa, de modo que las moléculas suficientemente pequeñas para penetrar en el interior de la matriz se retrasan y fluyen más lentamente a través de la columna, mientras que las moléculas más grandes eluyen más rápidamente y salen primero.

1.8. Diseño y síntesis de oligodeoxinucleótidos antisentido.

La administración *in vivo* de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) ha demostrado ser eficaz para reducir la síntesis de determinadas proteínas. En la actualidad no se conoce de forma precisa el mecanismo por el cual los ODNs penetran en las células, aunque parece intervenir un proceso de endocitosis de fase fluida, la pinocitosis, dependiente de la proteína quinasa C (*Wahlestedt, 1994*). Una vez en el interior celular, los ODNs inducen sus efectos interfiriendo en la traducción o desestabilizando el ARNm.

Los oligodeoxinucleótidos utilizados en nuestro estudio fueron diseñados con el programa de ordenador *PrimerSelect* (DNASTAR Inc, Madison, WI, USA) y sintetizados en el Servicio de Macromoléculas del Instituto Cajal.

Material es y Métodos

En la siguiente tabla, se muestran los ODNs empleados en el estudio donde en la primera columna se indica la proteína y el orden de la secuencia del ARNm de rata o ratón frente a la que van dirigidos, y en la segunda los nucleótidos que la constituyen.

ODN ₁₇₅₋₁₉₁ -PhLP _L	5'-T*C*TGTCCTTTGTCTT*C*A-3'
ODN ₂₇₈₋₂₉₂ -PhLP _L	5'-C*C*AGTCATTGATC*A*C-3'
ODN ₅₂₃₋₅₅₆ -Gα _{i2}	5'-A*T*GGTCAGCCCAGAGCCTCCGGATGACGCC*G*A-3'
ODN ₄₂₈₋₄₄₃ -RGS2	5'-C*T*CTATGAAGTCGG*T*A-3'
ODN ₇₄₃₋₇₅₈ -RGS2	5'-G*C*TGAATTCAAGGT*C*A-3'
ODN ₁₂₁₁₋₁₂₂₇ -RGS2	5'-C*A*CAGCATTCGGTC*C*A-3'
ODN ₁₀₅₋₁₂₀ -RGS3	5'-C*T*TCATGTCCTTGG*C*T-3'
ODN ₃₁₀₋₃₂₆ -RGS4	5'-G*G*ACTTAGTTTAGAA*G*G-3'
ODN ₃₈₉₋₄₀₄ -RGS5	5'-C*T*GTCTGGATGAAT*T*C-3'
ODN ₁₃₈₁₋₁₃₉₇ -RGS7	5'-G*G*TCTTGTCATAACT*C*T-3'
ODN ₅₃₂₋₅₄₇ -RGS9-2	5'-T*G*GATCAACATAGA*C*G-3'
ODN ₉₇₃₋₉₇₈ -RGS9-2	5'-C*T*CGAATACAGTTTCG*C*T-3'
ODN ₁₂₃₄₋₁₂₄₉ -RGS9-2	5'-C*G*CAGACCCACATT*T*A-3'
ODN ₁₆₅₋₁₈₀ -RGS12	5'-C*T*ACAGGCCTCTGA*C*A-3'
ODN ₄₃₁₋₄₄₆ -RGS14	5'-G*T*AGTGGCAGCTTG*T*A-3'
ODN ₈₃₂₋₈₅₀ -RGS16	5'-A*T*GTCCGTCTGTCCTT*C*C-3'
ODN ₂₉₃₋₃₀₉ Gβ ₅	5'-C*A*TGGTGACCGCGTG*C*T-3'

En ocasiones se utilizó como control un ODN aleatorio o *random* diseñado en el laboratorio (Garzón y col., 2001) para evaluar los posibles efectos tóxicos y/o variaciones de la analgesia producidas por la administración de nucleótidos sulfonados.

ODN-RD	5'-C*C*CTTATTTACTACTTTC*G*C-3'
--------	--------------------------------

Y para algunos de estos ODNs se generó su correspondiente control que consiste en variar algunos de los nucleótidos de su secuencia (que son los que aparecen en negrilla) refiriéndonos a ellos según la terminología inglesa como ODNs-*mismatch*, y que se sabe que no hibridan con ARNm de otras proteínas:

ODN ₁₇₅₋₁₉₁ -PhLP _L - <i>mismatch</i>	5'-T*C*TTGCTTGTTC*C*A-3'
ODN ₂₇₈₋₂₉₂ -PhLP _L - <i>mismatch</i>	5'-C*C*GATCTATGACTC*A*C-3'
ODN ₄₂₈₋₄₄₃ -RGS2- <i>mismatch</i>	5'-C*A*CTAAGATGTCCG*A*A-3'
ODN ₇₄₃₋₇₅₈ -RGS2- <i>mismatch</i>	5'-G*C*AGAATACATGGA*C*A-3'
ODN ₁₂₁₁₋₁₂₂₇ -RGS2- <i>mismatch</i>	5'-C*A*CTCCATACGCTG*C*A-3'
ODN ₅₃₂₋₅₄₇ -RGS9-2- <i>mismatch</i>	5'-T*C*GATGAACTAAGT*C*G-3'
ODN ₉₇₃₋₉₇₈ -RGS9-2- <i>mismatch</i>	5'-C*T*GCAATGCAGTTGC*C*T-3'
ODN ₁₂₃₄₋₁₂₄₉ -RGS9-2- <i>mismatch</i>	5'-C*G*TACACGCACTTA*T*A-3'

2.- Métodos

2.1.- Administración intracerebroventricular.

La estabulación y utilización de los animales se realizó siguiendo estrictamente la normativa vigente en la Unión Europea sobre el uso y experimentación con animales de laboratorio (*Council Directive 86/609/EEC*).

Las administraciones intracerebroventriculares (i.c.v.) fueron con inyecciones que se realizaron con una jeringa Hamilton de 10 μ l en el ventrículo lateral derecho en un punto que dista 2 mm hacia la zona caudal y 2 mm hacia la zona lateral de la bregma, con una profundidad de 3 mm. Todas las administraciones se realizaron en un volumen final de 4 μ l de solución que fue infundido a una velocidad de 1 μ l cada 5 segundos, en animales ligeramente anestesiados con éter.

2.1.1.- Administración i.c.v. de oligodeoxinucleótidos antisentido.

Con el fin de analizar los posibles cambios que sobre el efecto opioide ejercen distintas proteínas conocidas por modular la función de las proteínas G hemos administrado *in vivo* oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) dirigidos al ARNm que codifica la síntesis de dichas proteínas.

Para verificar la especificidad del tratamiento con ODNs se trabajó con tres grupos de ratones control que fueron incluidos en todos los experimentos: un grupo de animales no inyectados, otro al que se administró i.c.v. el vehículo (suero salino), y ratones inyectados i.c.v. con un oligodeoxinucleótido *mismatch* frente a la misma proteína o un ODN que contenía una secuencia no homóloga (*random*). El resto de los animales recibieron el tratamiento con uno de los ODNs frente a cada una de las proteínas objeto de estudio.

Los ODNs liofilizados fueron reconstituidos en un volumen apropiado de agua estéril inmediatamente antes de su inyección, que se realizó como se ha descrito en el

apartado anterior en el ventrículo lateral derecho, y para minimizar la posibilidad de que repetidas inyecciones i.c.v. originen neurotoxicidad, las administraciones de los ODN_s fueron hechas en un intervalo de 24 horas (*Chiasson y col., 1994*).

El tratamiento con cada oligodeoxinucleótido fue hecho en un grupo distinto de 15-20 ratones usando el siguiente patrón: el 1^{er} y 2^o día con 1 nmol, los días 3 y 4 con 2 nmol y el 5^o día con 3 nmol, siendo efectivo al cabo de 24 horas y se pierde a los 3-5 días.

Al 6^o día fueron inyectados i.c.v. los opioides agonistas y sus actividades antinociceptivas evaluadas por el test del *tail-flick*. Para los ensayos de inmunodetección y de unión de radioligandos se extrajeron las estructuras cerebrales deseadas y se procedió a su estudio siguiendo el protocolo que se detalla en cada uno de los apartados correspondientes.

2.1.2.- Administración i.c.v. de G α_{i2} -miristoiladas.

Las inyecciones intracerebroventriculares se realizaron en un volumen final de 4 μ l, en el ventrículo lateral derecho, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Se inyectó a los animales una única dosis de G α_{i2} -miristoiladas de 12 pmol (*Garzón y col., 1999*), al tiempo establecido en cada experimento, evaluándose el efecto antinociceptivo de la morfina.

2.2.- Administración de G α_{i2} -miristoiladas a cultivos de astrocitos.

Los cultivos de astrocitos obtenidos de corteza de rata postnatal fueron preparados como se indica en el apartado 1.2 de Materiales, siguiendo el protocolo establecido por McCarthy y Vellis (*1980*). En una parte de nuestro estudio, y con el fin de analizar la implicación de las caveolas en los procesos de reconocimiento e internalización de las G α_{i2} miristoilada exógena en células neurales, los astrocitos fueron incubados con la G α_{i2} recombinante marcada con una sonda fluorescente (FLUOS) durante 12 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo se procedió a lavar las células con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5, para retirar los restos del medio de

cultivo y del tratamiento, para posteriormente proceder a la solubilización del astrocito y la purificación de las caveolas, que tras su fijación en paraformaldehído al 4% fueron observadas con microscopía confocal.

Por otro lado, en el estudio diseñado para caracterizar el mecanismo de entrada, los astrocitos tras alcanzar la confluencia, fueron tripsinizados y cultivados en cubres de 10 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina (1,5 µg/mL). Al cabo de 24 horas se disminuyó el contenido de suero en el medio hasta 0,1% durante 12 horas para conseguir que todas las células estuviesen sincronizadas antes de comenzar el tratamiento. Los cubres fueron introducidos en placas de 12 pocillo (2 cubres por pocillo), e incubados *in vivo*, en presencia de 1 µl (0,1 µg/µl) de Gα_{i2} miristoilada exógena, en 600 µl de BME/F-0,1% durante 30 minutos, 2, 6 ó 12 horas a 37°C. Tras sucesivos lavados con el medio de cultivo, las células fueron tratadas 16 horas con Gα_{i2} miristoiladas previamente ligadas a un fluoróforo (FLUOS). Después de la incubación se lavaron los astrocitos con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5, y se fijaron con 4% paraformaldehído para proceder a cuantificar la fluorescencia incorporada con el CYTOFLUOR (2300 System, Millipore) y a su observación con el microscopio confocal, que nos permitió la localización subcelular de esta proteína.

2.3.- Medida del efecto analgésico evocado por diversos agonistas.

Para medir el efecto analgésico producido por distintos agonistas de receptores acoplados a proteínas G empleados en nuestro estudio se utilizó el test del *tail-flick* (test de la retirada de la cola) que consiste en la aplicación de un estímulo de tipo térmico en la cola del animal, para lo cual se introducen más de dos tercios de la misma en una cubeta con agua termostaticada a 52°C (Nott, 1968). La evaluación de la respuesta al dolor se realiza midiendo el tiempo (en segundos) que transcurre hasta que el animal reacciona al estímulo doloroso con un enérgico coletazo o sacudida corporal.

Los agonistas se disolvieron en suero salino y fueron administrados intracerebroventricular (i.c.v.) en un volumen final de 4µl a distintos grupos de animales. Las soluciones fueron hechas inmediatamente antes de su uso. La latencia del test se midió

a diferentes intervalos después de la administración de la sustancia objeto de estudio: 30 minutos (morfina, β -endorfina-(1-31), clonidina), 15 minutos (DAMGO, DPDPE) o 10 minutos ([D-Ala²] deltorfina II). Las latencias basales están comprendidas dentro de un rango de 1,3 a 2,2 segundos y no se afectaron tras la administración de un posible tratamiento con ODNs.

Con el fin de no producir daño tisular al animal se estableció un tiempo de corte de 10 segundos. Los resultados se expresan como la media \pm E.S.M. del porcentaje del máximo efecto posible (%MEP), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ MEP} = 100 \times \frac{(\text{latencia del test} - \text{latencia basal})}{(10 - \text{latencia basal})}$$

La significación estadística fue determinada por el análisis de la varianza seguido por el test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación fue de $P < 0,05$.

2.4.- Inducción de la tolerancia y la dependencia a morfina.

2.4.1.- Administración crónica de morfina y desarrollo de tolerancia.

La tolerancia a la morfina en el ratón se indujo por la administración subcutánea (s.c.) de una suspensión consistente en 50% de solución salina (NaCl al 0,9% en agua destilada), 42,5% de aceite mineral, 7,5% de arlacel A y 0,1g/mL de morfina base, que se administró en un volumen de 10 mL/kg de peso, lo que representa una dosis de morfina de 1g/kg, idéntica a la empleada por Christie y col. (1984).

Esta suspensión constituye una preparación de cesión lenta de morfina que proporciona unos niveles muy constantes del opiáceo en plasma durante al menos 3 días (Blasig y col., 1973; Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001).

El desarrollo de la tolerancia a la morfina crónica se determinó mediante la pérdida de efectividad analgésica en el test de *tail-flick* con estímulo térmico a distintos

tiempos tras la implantación de la suspensión oleosa. Se incluyó siempre en paralelo un grupo de animales control a los que se les implantó placebo (suspensión oleosa sin morfina) y que sirvieron para determinar la latencia basal.

2.4.2.- Administración de naloxona y desarrollo de la dependencia física.

La interrupción de la administración de un opioide en animales tolerantes da lugar a la expresión de la dependencia física, que se manifiesta con una serie de signos característicos que constituyen lo que se denomina síndrome de abstinencia (*Blasig y col., 1973; Francis y Collier, 1975*).

Para determinar el desarrollo de la dependencia física a la morfina se administró siempre a un grupo de animales tolerantes paralelo a los experimentales, el antagonista opioide naloxona, 5 mg/kg de peso corporal en el ratón por vía intraperitoneal (i.p.) (*Sánchez-Blázquez y Garzón; 1991*), 1, 3 ó 7 días después de la implantación de la morfina y se procedió a evaluar la aparición de algunos signos característicos del síndrome de abstinencia, de los cuales el más estudiado es, sin duda, la ejecución repetitiva de saltos (*jumping*).

Para cuantificar este parámetro, y por tanto el grado de dependencia a la morfina los animales se colocaron en un contenedor de metacrilato transparente de 28x28x40 cm de altura y se registró el número de ratones que presentaban esta conducta durante 30 minutos. Debido a que la mayor o menor incidencia de este signo se asocia con la intensidad del síndrome, también cuantificamos el número de saltos de cada animal durante los primeros 10 minutos, período en el que se producen más del 90% de los saltos que pueden llegar a contabilizarse en los 30 minutos.

Además, otros signos característicos del síndrome de abstinencia, entre los que se encuentran la diarrea y la pérdida de peso corporal, fueron observados en nuestro estudio.

2.5.- Radioinmunoensayo (RIA).

Con el fin de determinar los niveles de morfina presentes en suero y cerebro que son liberados de la suspensión oleosa del opioide a lo largo del tiempo, se aplicó la técnica del radioinmunoensayo, que se basa en una reacción antígeno-anticuerpo de unión competitiva. Grupos de seis animales que recibieron la suspensión oleosa fueron sacrificados por decapitación a los mismos intervalos en los que se midieron las respuestas analgésicas con el test de la retirada de la cola.

2.5.1.- Determinación de los niveles de morfina en suero.

Para medir la concentración del opioide circulante presente en el suero, se extrajo la sangre de los animales que se dejó coagular a temperatura ambiente durante 3-4 horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 1,000 xg 10 minutos, para eliminar las células sanguíneas, decantándose el suero que se fraccionó y se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

Se aplicó el sistema *Coat-A-Count* (*Diagnostic Products Corporation*) que utiliza un anticuerpo de alta afinidad por la morfina (antígeno) adsorbido en un tubo de plástico, haciendo muy difícil su disociación. El antígeno del suero en 750 μl de solución salina, se incubó en el tubo junto con 250 μl de la morfina marcada (^{125}I -morfina) durante 1 hora a temperatura ambiente, ambos compitieron por su unión al anticuerpo, de manera que se formaron dos tipos de complejos, el marcado y el complejo sin marcar. Por tanto, cuanto mayor cantidad de antígeno contenía la muestra, menos cantidad de complejo marcado se formó en el equilibrio, ya que en el ensayo la concentración del anticuerpo y el antígeno marcado son constante.

Transcurrida la incubación, las proteínas no unidas se eliminaron por decantación de la mezcla anterior y lavado con 1 mL de tampón fosfato salino pH 7,4 y la morfina del suero se detectó extrapolando la radiactividad del tubo, medida en un contador de radiación gamma (*LKB Compugamma CS counter*), con las medidas que se obtuvieron a partir de una curva de calibración realizada en paralelo en la que la muestra problema se sustituyó por cantidades conocidas de antígeno frío.

Cada muestra problema o punto de la curva de calibrado se realizó por duplicado. La curva estandar se construyó con las siguientes cantidades de morfina fría 25 y 75 pg y 0,25, 0,75, 2,5, 7,5, 25 y 75 ng. Además se incluyó:

- ▶ un tubo que nos indicó la radiactividad total presente en el ensayo que llevaba sólo la ^{125}I -morfina en el tampón de incubación, y no se procedió a su lavado.
- ▶ el blanco que llevaba una cantidad muy alta de morfina sin marcar (1 nmol/tubo) y se procesó de la misma manera que la muestra problema. Así, la ^{125}I -morfina quedó completamente desplazada y nos indicó la radiactividad residual del ensayo.
- ▶ otro tubo sólo con la ^{125}I -morfina que se procesó igual que la muestra problema, y nos permitió conocer el % de unión del antígeno-anticuerpo.

La sensibilidad de la técnica fue de 0,8 ng/mL de suero y mostró una reactividad cruzada inferior a 0,03% con la morfina-3-glucoronido y 0,1% para la morfina-6-glucuronido.

2.5.2.- Determinación de los niveles de morfina en cerebro.

Los cerebros fueron rápidamente extraídos y lavados en un tampón fosfato sódico (pH 7,4). Posteriormente se procedió a extraer la morfina del tejido, homogeneizándolo en 2 mL de agua destilada. Tras centrifugación a 40,000 x rpm en un rotor TLA-100.1 se obtuvo un precipitado y un sobrenadante que se liofilizó y se almacenó a -80°C .

En el momento de su uso, los liofilizados se resuspendieron en 150 μl de tampón fosfato salino 50 mM (pH 7,4), midiéndose los niveles de morfina de estos extractos por radioinmunoensayo, de la misma manera que en los sueros; los puntos de morfina fría incluidos en la curva de calibrado fueron: 0,3, 1, 3, 10 y 30 ng, además de un blanco. Las concentraciones fueron expresadas en nanogramos de morfina por gramo de tejido.

2.6.- Preparación de los distintos componentes celulares para su análisis.

2.6.1.- Fraccionamiento de las estructuras del S.N.C. de ratón.

El tejido neural es disgregado en sus diferentes tipos celulares, fundamentalmente neuronas y glia, que a su vez pueden ser fraccionadas en sus orgánulos y macromoléculas. Tras el sacrificio de los animales por decapitación, se disecaron las estructuras cerebrales en frío. El proceso se realizó a 4°C, empleándose un tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, sacarosa 0,32 M) que se encontraba a esa temperatura.

El tejido resuspendido en tampón se disgregó con un homogeneizador de teflón-vidrio, que rompe muchas de las membranas de la célula (incluidas la membrana plasmática y las membranas del retículo endoplasmático) y los fragmentos se unen inmediatamente formando pequeñas vesículas cerradas, que en el caso de las membranas plasmáticas se denominan sinaptosomas o microsomas si derivan del retículo endoplasmático. Este procedimiento de disgregación, aplicado cuidadosamente, dejó fundamentalmente intactos diversos orgánulos como el núcleo, las mitocondrias, el complejo de Golgi, los lisosomas y los peroxisomas.

A continuación, mediante el método de centrifugación se procedió a separar estos componentes celulares en función de su tamaño y su densidad. En general, las unidades mayores experimentan fuerzas centrífugas más altas y se desplazan por el tubo más rápidamente. Así, a una velocidad relativamente reducida, 1,000 xg durante 10 minutos, sedimentaron los componentes de tamaño mayor, como los núcleos y las células enteras formando un precipitado en el fondo del tubo de centrifuga (P₁). El sobrenadante (S₁) se sometió a una segunda centrifugación a 20,000 xg, 20 minutos, para obtener los sinaptosomas y microsomas (P₂). Posteriormente, se procedió a eliminar muchos de sus contaminantes, resuspendiendo de nuevo el precipitado P₂ y repitiendo el procedimiento de centrifugación. El sedimento final se resuspendió en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EGTA 1 mM y leupeptina 10 µM, a una concentración de proteína en torno a 3-5 µg/µl y se guardó a -70°C hasta el momento en que fueron empleadas.

De la misma manera, el sobrenadante (S₂) que constituye la fracción citosólica se concentró en un sistema *Ultrafree-MC 10,000 NMWL (Millipore)* para retención de moléculas con pesos moleculares superiores a 10 kDa, almacenándose a -70°C hasta su uso.

Para los estudios de localización subcelular, se procedió a la lisis de los núcleos y de la fracción P₂, con un medio hipotónico. La membrana nuclear fue sedimentada del extracto con una centrifugación a 22,000 xg, y para obtener las distintas fracciones del precipitado P₂, se expuso a altas velocidades de giro (ultracentrifugación), durante períodos más largos. Así, a velocidades de 45,000 xg se obtiene un sedimento que constituye las membranas plasmáticas sinápticas (*Synaptic Plasmatic Membranes*) y un sobrenadante S₂, el cuál al someterse a una centrifugación de 100,000 xg, se fracciona en las membranas microsomales (sedimento P₃) y su contenido (S₃).

2.6.2.- Obtención de las caveolas a partir de cultivos de astrocitos.

Las caveolas fueron obtenidas de cultivos de astrocitos de acuerdo al procedimiento descrito por Sargiacomo y colaboradores (1993), que se basa en el hecho de que las caveolas son insolubles en el detergente no iónico Triton X-100. El procedimiento se realizó a 4°C, y se añadieron inhibidores de proteasas a todas las soluciones empleadas (0,4 mM PMSF y 10 µg/µl de peptastina A y leupeptina).

Los cultivos confluentes de astrocitos se lavaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5 en frío para eliminar los restos de medio y se levantaron cuidadosamente de la placa de cultivo manteniendo su integridad celular. Posteriormente, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 700 xg, y solubilizadas en tampón MBS (25 mM MES pH 6,5, y 150 mM de NaCl) conteniendo 1% de Triton X-100 y 0,005% ADNasa I, durante 20 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, la muestra fue disgregada con un homogeneizador de teflón-vidrio, y tras una incubación de 10 minutos en frío, fue nuevamente disgregada.

El homogeneizado se ajustó a un 40% de sacarosa (por adición de una solución al 80% en tampón MBS) y 2,5 mL se cargaron en la parte superior de un gradiente

lineal de 5-30% de sacarosa en MBS sin Triton X-100. Tras centrifugación a 188,000 xg en un rotor Vti50 (Beckman, Palo Alto, CA), se obtuvo una banda opaca entre el 10-20% sacarosa, en la que se encuentran los complejos insolubles en Triton X-100, entre ellos las caveolas, que se recogieron en fracciones de 2 mL. Por adición de ácido tricloroacético 72% a cada fracción, precipitamos las proteínas y analizamos la presencia de caveolina por *Western blot* con un anticuerpo dirigido al extremo N-terminal de la proteína, previo a su análisis por microscopía electrónica o confocal.

2.7.- Electroforesis de proteínas y transferencia a soporte sólido: detección inmunológica (Western blotting).

Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa, que refleja la de los aminoácidos cargados que contienen, pudiendo separarse en función de esta carga, de su tamaño y de su forma si se aplica un campo eléctrico (electroforesis).

2.7.1.- Preparación de las muestras para SDS/PAGE (SDS-PolyAcrylamide-Gel Electrophoresis).

Se descongeló la proteína y se resuspendió a una concentración de 2-4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en tampón de solubilización de muestras para SDS/PAGE (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 3%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 3%, azul de bromofenol 0,005%), calentándose a 100°C 5 minutos.

El SDS se ha utilizado para minimizar la agregación molecular y asegurar la completa disociación de las proteínas en sus subunidades individuales, antes de que sean cargadas en el gel. El SDS es un fuerte detergente aniónico que se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas, haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, así, las proteínas quedan liberadas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas y se disuelven libremente en la solución del detergente. Además, la carga neta de la proteína queda enmascarada por la carga negativa del SDS, y las proteínas muestran una relación carga-masa, que hace que migren hacia el electrodo positivo cuando se aplica un voltaje, separándose de acuerdo a sus masas moleculares y la selección de tamaños impuesta por los poros del gel.

Por otro lado, el β -mercaptoetanol es un agente reductor que rompe los enlaces S-S que pudieran existir en las proteínas, de forma que puedan analizarse por separado todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas que tengan varias subunidades.

Las muestras así solubilizadas se someten a electroforesis, cargándose en los pocillos de los geles (1-100 μ g de proteína). Igualmente, se cargaron en algunas calles estándares comerciales de proteínas precoloreadas, de pesos moleculares conocidos, que permitieron seguir el desarrollo de la electroforesis, estimar la eficacia de la transferencia, y servir de referencia para asignar pesos moleculares aparentes a las proteínas de interés.

2.7.2.- Electroforesis SDS-PAGE.

En nuestro estudio, como matriz inerte a través de la cual migran las proteínas, hemos utilizado un gel de poliacrilamida de generalmente 0,15x12x10 cm, dispuesto verticalmente; el tamaño del poro del gel se ajustó de forma que fuera el adecuado en cada uno de los estudios para retrasar la migración de las moléculas proteicas de interés. De esta forma, las proteínas pequeñas se desplazan rápidamente a través del gel, mientras que las grandes permanecen arriba, cerca del punto de aplicación de la muestra, siendo el desplazamiento de la mayoría de las cadenas polipeptídicas, en condiciones ideales, linealmente proporcional al logaritmo de su masa.

La electroforesis precisó de geles con dos zonas (la concentradora y la separadora) y varios tampones que difieren en su pH y fuerza iónica. Las muestras que contenían las proteínas a separar se aplicaron al gel, de manera que fueron conducidas por un frente móvil creado al aplicar un campo eléctrico entre los electrodos. Después de la migración a través del gel concentrador, de alta porosidad, los complejos SDS-proteína se depositaron en una zona muy delgada sobre la superficie del gel separador ordenados en bandas de peso molecular creciente. A medida que los complejos penetraron en el gel separador, su movimiento se hizo más lento como consecuencia de los impedimentos estéricos generados por el tamaño de poro del gel.

La electroforesis se llevó a cabo a 4°C, en cubetas (*Hoefler SE 280*), aplicándose una intensidad de corriente de 15-20 mA por gel (fuente de alimentación *ISCO 595*). La

muestra y la zona del gel concentrador contienen Tris-HCl pH 6,8, el tampón de los reservorios superior e inferior contiene Tris-HCl pH 8,3 y glicina, y el gel separador Tris-HCl pH 8,8, además todos los componentes del sistema presentan un 0,1% de SDS.

Una vez separadas las proteínas de la mezcla, mediante electroforesis SDS-PAGE, fueron transferidas a partir del gel a un soporte sólido (Transferencia Western), de modo que identificamos una proteína determinada mediante su unión con anticuerpos específicos.

2.7.3.- Transferencia de proteínas a soporte sólido: detección inmunológica (Western blotting).

Siguiendo la técnica de *Western blotting* (transferencia *Western*), las proteínas fueron transferidas desde el gel a un filtro sólido de 0,2 μ de nitrocelulosa o principalmente de PVDF (**polivinil-difluoruro**) debido a su gran resistencia a la manipulación, capacidad para ser ensayados sucesivamente con distintos anticuerpos y sobre todo por su alta capacidad de adsorción de proteínas (alrededor de 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). El filtro fue expuesto a soluciones de anticuerpos primarios específicos para la proteína de interés y allí pudo ser detectada con anticuerpos que reaccionaron específicamente con sus epítomos antigénicos. Así, la transferencia Western resultó extremadamente útil para la identificación y cuantificación de proteínas específicas a partir de mezclas complejas de proteínas.

Para realizar la transferencia electroforética, el gel se colocó sobre un filtro, situándose entre varias hojas de papel Whatman 3MM, dos esponjas porosas y dos soportes de plástico. Esta construcción se colocó en una cubeta *Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad)* y se sumergió en un tampón Tris-HCl, pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,04% y metanol 20% de modo que el filtro estaba orientado hacia el ánodo, aplicándose un voltaje de 70 V (200-300 mA) durante 120 minutos, que permite la transferencia de las proteínas desde el gel hacia el ánodo y por consiguiente hacia la membrana donde son retenidas.

Para la transferencia de proteínas de peso molecular superior a 60 KDa se redujo el contenido de metanol en el tampón de transferencia hasta un 10%.

- **Bloqueo de la membrana.**

Una vez que las proteínas fueron transferidas a la membrana, bloqueamos los potenciales sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, de modo que se minimizó el fondo, con proteínas de leche deshidratada y deslipidada (*Blocker, BioRad*) preparada al 5% en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,7 y NaCl 250 mM. El bloqueo se realizó durante 1 hora, a 25°C.

- **Incubación del anticuerpo primario con la proteína de interés.**

La detección inmunológica de la proteína de interés se hizo de manera indirecta, en dos etapas: en primer lugar, el anticuerpo específico, no marcado, se incubó 12-48 horas a 4°C (*Hoefler Dec Probe P 150*) con la membrana donde se encontraban inmovilizadas las proteínas, en presencia de un agente bloqueante cuando el revelado fue por quimioluminiscencia. Seguidamente, se lavó la membrana con Tris-HCl 50 mM pH 7,7, NaCl 100 mM, y 0,1% Tween 20 y se procedió a su incubación con anticuerpo secundario tipo anti-inmunoglobulina, acoplado a la enzima peroxidasa. Posteriormente, se realizaron nuevos lavados y finalmente el complejo antígeno-anticuerpo primario-anticuerpo secundario-enzima, se localizó por reacción enzimática *in situ*.

- **Detección y revelado.**

En la mayoría de los experimentos utilizamos el sistema de revelado cromogénico mediante el sustrato soluble 3,3'-diaminobencidina que es captado por el enzima inmunoacoplado (peroxidasa) dando lugar a un producto de color marrón más o menos oscuro que precipita *in situ* y permite cuantificar por densitometría la proteína objeto de estudio. La reacción fue catalizada con el peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,02%, intensificándose el color con cloruro de níquel.

En aquellos ensayos en los que fue necesario aumentar la sensibilidad utilizamos un sistema comercializado de emisión de luz, conjugado indirectamente con un anticuerpo marcado con peroxidasa (*Santa Cruz*). Este método utiliza un mecanismo basado en la oxidación de diacilhidracidas cíclicas catalizada por un sistema peroxidasa/peróxido de hidrógeno en solución alcalina. Tras la oxidación, la

diacilhidracida se encuentra en un estado excitado, de forma que rápidamente decae a un estado energético inferior, con la consiguiente emisión de luz, la cual se utiliza para obtener un registro de autorradiografía.

2.8.- Isoelectroenfoque.

Para cada proteína existe un pH característico, denominado *punto isoeléctrico*, al que la proteína no presenta carga neta debido a que las cargas positivas y negativas se anulan y, por lo tanto, no migrará en un campo eléctrico. En este hecho se basa el isoelectroenfoque o enfoque isoeléctrico.

En un primer paso la muestra (20 µg de la PhLP_L recombinante o purificada a partir del cerebro de ratón) se disolvió en un volumen reducido de una solución que contenía el detergente CHAPS (*3-(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio propane sulphonate*), y unos reactivos desnaturalizantes como la urea y el β-mercaptoetanol. Esta solución disolvió, desnaturalizó y disoció todas las cadenas polipeptídicas sin alterar su carga intrínseca. Luego, las proteínas fueron sometidas a electroforesis en el sistema Multiphor II IEF (*AmershamPharmacia*) en un gel de poliacrilamida en el que se ha establecido un gradiente de pH de 4-7 mediante unas mezclas de amortiguadores especiales anclados en el gel (*Immobiline DryPlate 4-7*). Estos geles fueron previamente hidratados con una solución que contenía urea (8 M), CHAPS (2% w/v), ditiotreitól (10 mM) y anfolitos pH 3,5-10 (2% v/v) (*BioRad*).

Después de colocar el gel y los electrodos sobre la bandeja de electroforesis, se depositó la muestra lentamente sobre el extremo de la tira correspondiente al cátodo. El voltaje aplicado fue linealmente incrementado desde 300 hasta 3500 V durante 3 horas, para evitar que la corriente creada por el movimiento de los anfolitos genere un calor excesivo, y el isoelectroenfoque se completó a las 12 horas. Así, la proteína se desplazó hasta la zona de gradiente que presentaba un pH igual a su punto isoeléctrico, y allí permaneció inmóvil, siendo fácilmente detectada al teñir el gel con el colorante azul de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue R-250, BioRad*).

El punto isoeléctrico de la PhLP_L se calculó en base a unos estándares sometidos a isoelectroenfoque en el mismo gel que la muestra, cuyos puntos isoeléctricos estaban comprendidos en el rango de pH de 3,6-6,6 (*Sigma*).

2.9.- Ensayo de fosforilación de la PhLP_L.

2.9.1.- Fosforilación por PKAc.

1 µg de la PhLP_L purificada del cerebro de ratón fue incubada con 2 unidades de la subunidad catalítica de la PKA (*protein kinase A*) (*Calbiochem-Novabiochem*) en un tampón HEPES 50 mM pH 7,4, que contenía MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, EGTA 1 mM, ditioneitol 0.5 mM, AMPc 2 µM y ATP 20 µM. La reacción se inició con la adición de [γ^{32}]ATP (~3000 Ci/mmol) (*NEN*) en un volumen de reacción de 60 µl. A los 15 minutos de incubación a 32°C, la mezcla fue calentada a 90-100°C durante 10 minutos para inactivar la PKA.

La quinasa fue eliminada del medio por inmunoprecipitación con 2 µg de un anticuerpo (IgG2b) específico a la subunidad catalítica de la PKA (*Transduction Labs.*) tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente y posterior precipitación con proteína A-agarosa (*BioRad*). El control, sin PhLP_L, fue tratado en las mismas condiciones. Los inmunocomplejos fueron eliminados por centrifugación y la fase soluble se resolvió por SDS/PAGE seguida de autorradiografía para localizar la banda de la PhLP_L marcada con ³²P (43 kDa).

2.10.- Deglicosilación de la PhLP_L.

Se siguió el protocolo descrito por Eppler y colaboradores (1993), de manera que las glicoproteínas obtenidas a partir de cromatografía de afinidad en columna de lectina de germen de trigo (apartado 1.4.1 de Materiales), se precipitaron con acetona al 60% (enfriada en hielo seco) y se centrifugaron a 12,000 xg, 15 minutos, a 4°C, resuspendiéndose a una concentración final de 4 µg/µl de proteína en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7,7, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1%, SDS 0,1% y ditioneitol 1 mM, para su solubilización a 100°C 10 minutos.

Tras esto, se le añadieron 4 volúmenes de tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.7, EDTA 20 mM y octiltioglucoído 0.65%, que ayuda a eliminar el SDS de las proteínas. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, y sobre ella se llevó a cabo la reacción de deglicosilación, con la enzima N-glicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum* (Boehringer Mannheim), preparada en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.2, EDTA 25 mM, azida sódica 5 mM, glicerol 50%, a una concentración de 100 u.e./0,5 mL).

La reacción se inició añadiendo sobre la mezcla una cantidad de enzima de 1 unidad/30 µg de proteína o el volumen correspondiente de tampón de la enzima (al control) y tuvo lugar a 37°C, durante 18 horas.

Transcurrido este tiempo, las muestras se procesaron para ser analizadas por SDS/PAGE. La proteína fue concentrada por precipitación con acetona y solubilizada en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, SDS 3%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 3% y azul de bromofenol 0,005% a 100°C, 5 minutos. Las muestras fueron inyectadas en geles largos (0,15x12x10cm) en gradiente de poliacrilamida (10-20%), llevándose a cabo la electroforesis e inmunodetección con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L como se ha descrito anteriormente.

2.11.- Estudios de inmunoprecipitación.

Los astrocitos fueron solubilizados durante 5 sg de sonicación (x2) en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, PMSF 0,1 mM, con una mezcla de inhibidores de proteasa (P8340 Sigma), y una mezcla de inhibidores de fosfatasas (P2850 Sigma). Después de incubar los lisados con 20 µl de proteína-A agarosa (BioRad) durante 1 h a 4°C, para eliminar las uniones inespecíficas, los sobrenadantes fueron incubados con 2,5 µg/mL de IgG anti-Phd/PhLP_L y 50 µl de proteína-A agarosa. Los inmunocomplejos fueron obtenidos por centrifugación a 1,000 xg (20 segundos), tras cinco lavados de 20 minutos cada uno con 1 mL del tampón anterior, y solubilizados para su análisis por SDS-PAGE en geles de 8-16% de acrilamida/bisacrilamida.

2.12.- Determinación de la actividad GTPásica de las $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas administradas in vivo a ratones knock-down.

Las subunidades $G\alpha$ son enzimas, que unen e hidrolizan GTP a GDP y fosfato libre (Pi), de esta manera, la funcionalidad de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas administradas i.c.v., se determinó en ratones en los que se encuentra disminuida la síntesis de esta proteína (*knock-down*).

Tras el tratamiento subcrónico con el ODN- $G\alpha_{i2}$, los animales recibieron 12 pmol/ratón, como se describe en el apartado 2.1.2 de esta sección, y a las 24 horas, fueron sacrificados, extrayéndose la SGPA. Las estructuras procedentes de 8 ratones se procesaron para obtener las fracciones de membrana (P_2), sobre las que se llevo a cabo la determinación de la actividad GTPásica asociada a proteínas G, que consiste en medir la liberación de ^{32}Pi a partir de $[\gamma^{32}\text{P}]$ GTP.

El ensayo utilizado es una modificación del método de Cassel y Selinger (1976) para mejorar el rendimiento. El medio de incubación es un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, ditiotreitól 2 mM, dimiristoilfosfatidil colina 0,4 mM y $[\gamma^{32}\text{P}]$ GTP 0,4 nM, que contiene además GTP (3-300 μM) y el análogo no metabolizable del ATP AppNHp 0,25 mM, para suprimir al máximo las actividades nucleótido trifosfatasa no específicas; ouabaína 1 mM con la que inhibimos la ATPasa de Na^+/K^+ evitando la hidrólisis no específica de GTP; y para evitar que las actividades nucleósido quinasa y adenilato quinasa, presentes en las membranas, redistribuyan la radiactividad tanto a nucleótidos de adenina como de guanina, se incorporó un sistema regenerador de ATP formado por la fosfato de creatina 10 mM y la creatina fosfoquinasa 2,5 unidades, incluyendo ATP 1 mM que, se sabe, mejora el rendimiento de este sistema.

En el medio de incubación también se incluyen MgCl_2 5 mM y NaCl 100 nM, el primero es necesario para que se produzca la disociación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$, y el NaCl para disminuir la interacción de los receptores desocupados con las proteínas G (Carty y col., 1990, Koski y col., 1982, Costa y col., 1990). De hecho, la actividad GTPásica basal se debe a esa interacción y en ausencia del ión sodio, la

actividad basal es tan grande que impide estudiar la estimulación de la enzima por agonistas.

Las membranas se equilibraron con los agonistas (DAMGO, DPDPE y clonidina 100 nM y R-PIA 10 μ M) antes de iniciar la reacción enzimática, 1 hora en frío (4°C). A continuación, se añadió el medio de incubación precalentado y la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l durante 20 minutos a 37°C

Tras la incubación, las muestras se enfriaron en un baño de hielo (en esas condiciones la hidrólisis de [γ ³²P] GTP es inapreciable), y se añadieron 900 μ l de una suspensión de carbón activo al 5% (peso/volumen) en ácido fosfórico 20 mM (pH 2,3) a 4°C para separar el ³²Pi del [γ ³²P] GTP no hidrolizado. Después de realizar una centrifugación a 11 000 xg durante 15 minutos se recogieron 500 μ l del sobrenadante (donde se encuentra el ³²Pi) a los que se añadieron 2 mL de líquido de centelleo (*ECOLUME, ICN*). Por último se procedió a su contaje radiométrico en un contador de centelleo (*Beckman, LS-5801*).

2.13.- Ensayos de unión de radioligandos.

Se emplearon membranas P₂ de SPGA de ratón, tratados con oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) inyectados i.c.v. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última inyección y se disecó la SGPA, preparándose las membranas, según el protocolo descrito anteriormente, que fueron resuspendidas a una concentración de proteína de 2 μ g/ μ l en tampón Tris-HCl 25 mM pH 7,5 suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (0,2 mM PMSF, 2 μ g/mL leupeptina, y 0,5 μ g/mL aprotinina) y conservadas a -70°C hasta el momento de realizar los experimentos.

En general, los radioligandos agonistas marcan únicamente una porción de la población total de receptores, la que corresponde a los receptores acoplados a proteínas G en estado de alta afinidad, por lo que refleja las alteraciones del receptor con relevancia biológica. Por esta razón, se eligió como radioligando el agonista opioide [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) (IM 162, 2000 Ci/mmol), adquirido a *AmershamPharmacia*, que presenta

alta afinidad por los receptores opioides μ y δ y una elevada actividad específica, así pudieron usarse concentraciones bajas, lo que redundó en una menor unión no específica.

La [125 I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) liofilizada tuvo que ser resuspendida en 100 μ l de agua destilada resultando en 0,25% BSA (*bovine serum albumina*), 5% lactosa, 0,2% hidrocloreuro L-cisteína, 10 mM ácido cítrico y 800 KIU/mL aprotinina. Con el fin de disminuir la adsorción del péptido iodado los experimentos se llevaron a cabo en tubos de vidrio siliconizados en un volumen final de 2 mL con una concentración final de membranas de 0,2 mg/mL, 0,2% BSA y 0,01% bacitracina en 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

La afinidad con la que el ligando marcado se une a sitios μ se determinó por ensayos de saturación con concentraciones crecientes del [125 I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) (1pM-3nM), en presencia de ICI-174864 300 nM (*RBI*). Este antagonista opioide δ -selectivo, a dicha concentración, bloquea la unión de [125 I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) a receptores tipo δ , restringiendo las uniones específicas del neuropéptido sólo a receptores opioides μ (*Garzón y col., 1998*). La unión inespecífica se determinó en presencia de 1 μ M de β -endorfina humana (1-31) (*Peninsula Laboratories*).

En todos los casos, los tubos de reacción se incubaron 90 minutos en un incubador a 25°C y en agitación, condiciones en las que se alcanza una situación de equilibrio. Transcurrido ese tiempo, el contenido de los tubos se filtró rápidamente a través de filtros de fibra de vidrio (*Whatman GF/B*) previamente sumergidos durante 3 horas en tampón Tris-HCl/0,3% polietilamina pH 7,5-7,7. Los filtros se lavaron 3 veces con 4 mL de este tampón, a 4°C, realizándose el conteo en un contador de radiación gamma (*LKB Compugamma CS counter*).

2.14.- Microscopía electrónica.

2.14.1.- Fijación.

Debido a que las muestras para microscopía electrónica han de ser expuestas a un vacío muy intenso, no es posible la observación de las muestras vivas y húmedas. De

esta manera, una vez purificada la fracción rica en caveolas, se fijó primero con glutaraldehído 2,5%, que une covalentemente las moléculas proteicas a sus vecinas, durante 60 minutos. Después se lavaron dos veces con tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5, siendo el tiempo de cada lavado de 2 minutos, y se fijaron 1 hora con tetróxido de osmio, que une y estabiliza las bicapas lipídicas y también las proteínas. Una vez transcurrido ese tiempo, los cortes se lavaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5.

2.14.2.- Deshidratación e inclusión.

Debido a que los electrones tienen un poder penetrante muy limitado, normalmente los tejidos fijados son cortados en secciones extremadamente finas antes de poder observarlos. Esto se logra deshidratando la muestra e infiltrándola con una resina monomérica que polimeriza formando un bloque sólido de plástico.

Así, se procedió a deshidratar la muestra pasándola por alcoholes de concentración creciente (70°, 96°, 100°), se realizaron dos baños de cinco minutos cada uno, excepto en el caso del alcohol de 100°, en el que la duración fue de diez minutos cada uno. Después de la deshidratación, los cortes se sumergieron dos veces, durante diez minutos, en 1,2-óxido de propileno puro.

Seguidamente, las muestras se introdujeron en una mezcla araldita/óxido de propileno (1:1) durante una hora. La composición de la resina araldita es: 10 gramos de Araldita 502 resina, 8 gramos de anhídrido de un ácido dicarboxílico con cadena lateral alifática (DDSA) y 0,5 mL de ftalato de butilo (BDMA). A continuación, los cortes se sumergieron en araldita pura y se guardaron a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se preparó, en una cápsula Beem, una mezcla nueva de araldita en la cual se introdujeron las muestras durante 3-4 horas, esta vez a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a polimerizarlos en una estufa a 60°C durante 48 horas.

2.14.3.- Cortes semifinos, ultrafinos.

Tras la polimerización, el bloque sólido de resina se observó al microscopio óptico para seleccionar las áreas de estudio, y se procedió a cortar con una cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo Reichert-Jung ULTRACUTE, con un espesor de 1-2 micras, obteniéndose así los cortes semifinos. Seguidamente, estos cortes se depositaron en un portaobjetos con Araldita polimerizada y se tiñeron con azul de toluidina-bórax. Tras observarlos al microscopio óptico, se seleccionaron las zonas de interés para su observación al microscopio electrónico, y se realizan en las zonas elegidas los cortes ultrafinos.

Para ello, el corte se transfiere a una cápsula Beem con Araldita 502, y se adhiere con adhesivo cianocrílico. Los cortes ultrafinos se realizaron con un ultramicrotomo Reichert-Jung ULTRACUTE a 70 nm y se recogieron en rejillas de ojal cubiertas con una membrana de Formvar.

2.14.4.- Tinción y observación al microscopio electrónico.

Por último y con el fin de aumentar el contraste de la muestra, procedimos a su tinción con nitrato de plomo. Para ello, las rejillas se colocaron sobre una gota de acetato de uranilo, previamente filtrado, y se mantuvieron en oscuridad durante 1 hora.

Posteriormente, se efectuaron tres lavados con agua destilada y se colocaron las rejillas sobre una gota de nitrato de plomo en una atmósfera saturada de NaOH, que evita la formación del precipitado de carbonato de plomo, el cual entorpece la observación del corte en el microscopio. De nuevo, se lavan las rejillas en abundante agua destilada y se dejan secar.

Finalmente, los cortes se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II a 80 KV.

2.15.- Microscopía confocal.

El microscopio confocal utiliza una óptica fluorescente, pero en lugar de iluminar toda la muestra a la vez, en cada instante enfoca un pequeño punto luminoso en una profundidad determinada de la muestra y consigue una elevada resolución al eliminar la luz que proviene de las zonas fuera de los focos superior e inferior a este plano.

Para la observación de las muestras al microscopio confocal se procedió a administrar a cultivos de astrocitos confluentes de corteza cerebral de rata, crecidos sobre cubres de cristal de 10 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina, o sobre placas de Petri de 9 cm de diámetro, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de la proteína recombinante $\text{G}\alpha_{12}$ -miristoilada marcada con una sonda fluorescente (FLUOS) en BME/F-1S. Los protocolos completos en los que se indican los tiempos de incubación y las cantidades administradas, se detallan puntualmente en cada uno de los experimentos correspondiente.

En todos los casos, tras el tratamiento con las $\text{G}\alpha_{12}$ -miristoiladas exógenas, los astrocitos se lavaron varias veces con tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, para eliminar el medio de cultivo y la $\text{G}\alpha_{12}$ exógena que no ha penetrado en el interior de la célula. Previo a la observación con el microscopio confocal, las muestras fueron fijadas con 4% de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente. Y para favorecer la observación en el confocal se depositaron unas gotas de tampón fosfato/glicerol al 50%, entre el porta donde se coloca la muestra y el cubreobjeto, evitando la presencia de burbujas de aire entre la película oleosa y el cristal que entorpecen el estudio.

Finalmente, las muestras fueron examinadas con el microscopio confocal (*LEICA TCS 4D*) equipado con un láser de argón/criptón con un pico de excitación de 488 nm, obteniéndose imágenes de alta resolución que nos permitieron determinar la distribución de la $\text{G}\alpha_{12}$ exógena en la célula, y cuya información pudo ser cuantificada con el CYTOFLUOR (*System 2300, Millipore*).

Resultados

1.- Desarrollo de la tolerancia y dependencia a la morfina crónica.

El presente estudio fue diseñado para confirmar el desarrollo de la tolerancia a la morfina crónica en ratones a los que se les administró vía subcutánea (s.c.) una suspensión oleosa del opioide, con el fin de utilizar este modelo en los estudios bioquímicos y comportamentales.

Con este objetivo a los ratones se les implantó 10mL/kg de una suspensión oleosa que contiene 0,1g/mL de morfina, y el desarrollo de la tolerancia se determinó mediante la pérdida de efectividad analgésica en el test del *tail-flick*. La dependencia se indujo al administrar por vía intraperitoneal 5 mg/kg del antagonista opioide naloxona, provocando la aparición brusca del síndrome de abstinencia. Las características observadas para medir la dependencia fueron la conducta de salto típica de este síndrome (*jumping*), la pérdida de peso corporal y la diarrea.

Los niveles de morfina en suero y cerebro de estos ratones también se determinaron por radioinmunoensayo con el fin de poder establecer una correlación farmacológica de los efectos analgésicos medidos, con la presencia del opioide que se libera de la suspensión en el transcurso del tiempo.

Durante la primera hora del tratamiento crónico, la analgesia alcanzó el umbral prefijado de seguridad de 10 segundos de latencia en el test, después la respuesta comienza a disminuir de forma dependiente del tiempo. Así, aunque la morfina presenta niveles circulantes que alcanzan valores entre el rango de 13 a 2 nmol/mL en sangre desde las 3 horas hasta los 3 días de la implantación de la suspensión de morfina (Figura 14), el nivel de analgesia con respecto al grupo de animales control es a las 6 horas de sólo un 50%. Los ratones rápidamente desarrollaron tolerancia a este efecto la cuál fue máxima a las 24-48 horas después de iniciar el tratamiento crónico con el opioide (Figura 15). Al cuarto día los valores medidos en sangre de morfina fueron de 1 nmol/mL y descendieron a 0,008 nmol/mL al séptimo día. Además, la desaparición de la morfina del suero se correlaciona con un aumento gradual en la respuesta a una dosis de 10 nmol de morfina administrada vía intracerebroventricular (i.c.v.), que se

sabe produce acerca de un 80% del máximo efecto posible (MEP) en ratones control (Figura 15). La potencia de esta dosis de morfina se recupera a los 10 días de la implantación de la suspensión oleosa.

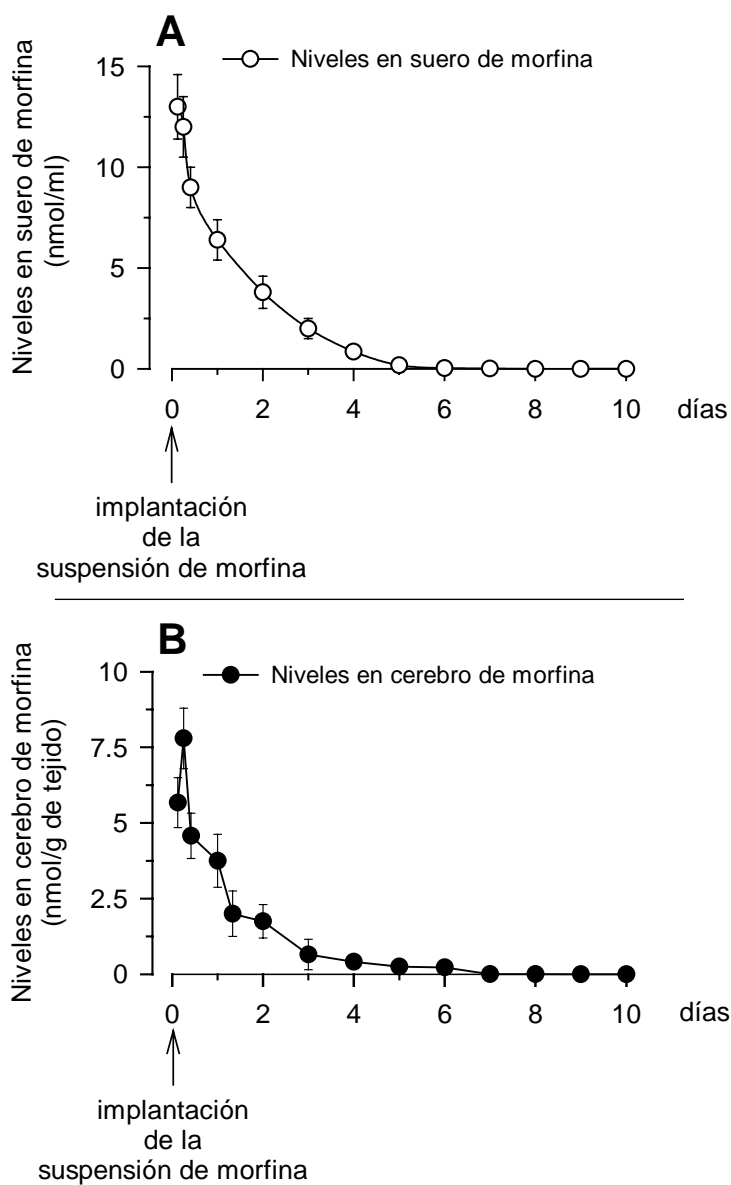


Figura 14. Los niveles de morfina liberados de la suspensión oleosa en (A) suero (nmol/mL) y (B) cerebro (nmol/g de cerebro) fueron analizados hasta el décimo día después de la implantación de la suspensión del opioide mediante radioinmunoensayo. Cada punto es la media \pm E.S.M. de los valores obtenidos en 4-6 ratones. El análisis estadístico aplicado fue, como en los experimentos anteriores, el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

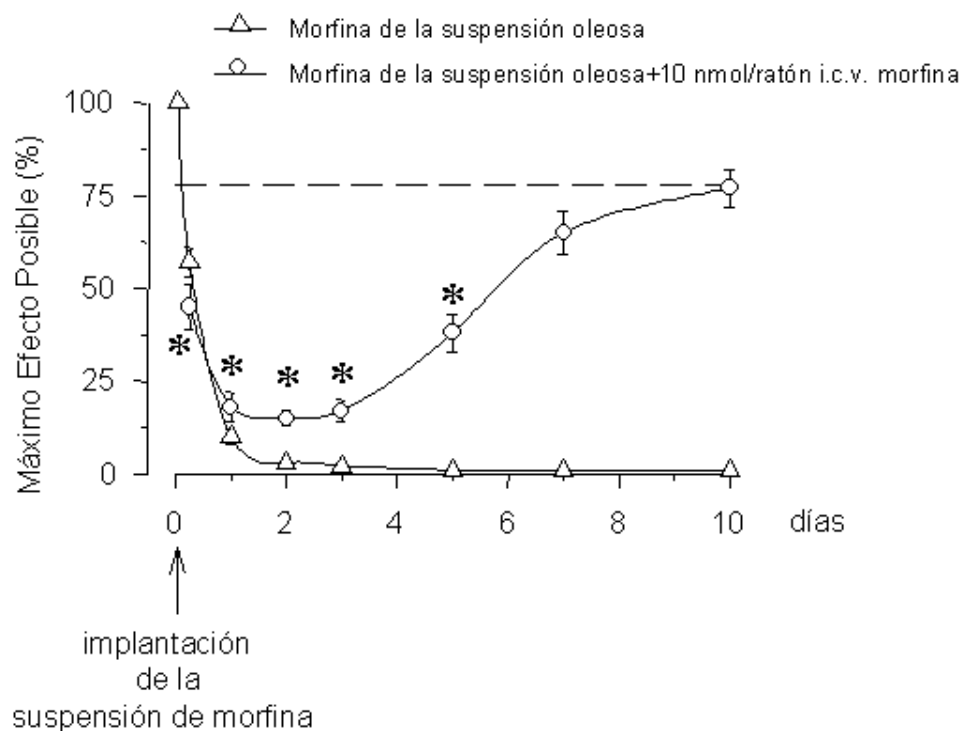


Figura 15. Evaluación del desarrollo de la tolerancia. A los animales, a tiempo 0, se les inyectó la suspensión oleosa de morfina (0,1 g/mL) vía s.c., evaluándose la respuesta analgésica a diferentes intervalos (Δ), mediante el test de *tail-flick*. En paralelo, se midió a los mismos intervalos y en grupos de animales distintos, que también han recibido la suspensión del opioide, la antinocicepción inducida por una dosis de morfina (10 nmol/ratón), administrada i.c.v. (O). Para cada intervalo se utilizó un grupo de animales diferente. Los valores son la media \pm E.S.M. de grupos de 8 a 15 animales. * Diferencias significativas respecto al grupo control implantado con la suspensión oleosa de morfina que recibieron el vehículo salino en lugar de la morfina i.c.v. (ANOVA, Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$). La línea discontinua indica el efecto analgésico inducido por una dosis i.c.v. de 10 nmol de morfina en ratones que han recibido la suspensión oleosa sin morfina (placebo).

Estos resultados fueron completados con los obtenidos al precipitar el síndrome de abstinencia a ratones expuestos a la morfina crónica, tras la administración i.p. de 5 mg/kg del antagonista opioide naloxona. A las 24 horas después de iniciar el tratamiento con el opioide, la mayoría de los ratones (>95%) presentaron diarrea, y un número de saltos por ratón de una media de $26 \pm 6,5$ ($n=20$) (Figura 16). Estos animales también

mostraron una pérdida de peso corporal de $5,3 \pm 0,4\%$. Sin embargo, a los 7 días de iniciar el tratamiento con la morfina la naloxona no fue capaz de inducir ninguno de estos síntomas.

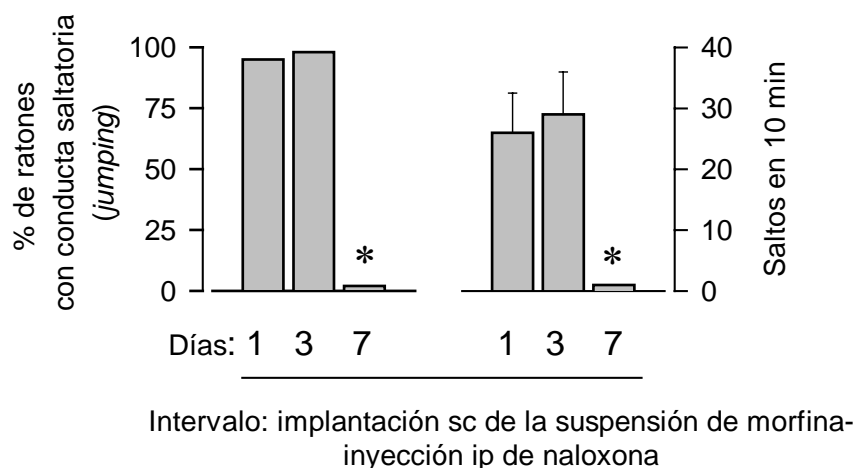


Figura 16. El grado de dependencia a la morfina se valoró midiendo la intensidad del síndrome de abstinencia en ratones tolerantes. Transcurridos 1, 3 ó 7 días de la inyección s.c. de la suspensión del opioide, se precipitó el síndrome de abstinencia con la administración de naloxona (5 mg/kg i.p.). El signo analizado fue la conducta saltatoria (*jumping*) típica de este síndrome, su presencia e intensidad, fue evaluada en los grupos de animales tolerantes a los distintos intervalos. Los valores son la media \pm E.S.M. (n=20). * Diferencias significativas con respecto al grupo de animales control. Se aplicó el test de probabilidad de Fisher para determinar el % de ratones que presentan este signo, o el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls para su cuantificación. El nivel de significación empleado fue de $P < 0,05$.

Por tanto, el uso de la suspensión oleosa proporciona un modelo que permite alcanzar rápidamente niveles de morfina en suero que disminuyen paulatinamente hasta los 4 ó 5 días tras su implantación s.c.. Así, se obtienen animales post-dependientes a los 6-8 días de iniciar el tratamiento crónico, sin requerir la eliminación de la suspensión oleosa del opioide.

2.- Efecto de la administración crónica de opioides sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratón.

La activación crónica del receptor opioide tipo μ desencadena en las células una serie de mecanismos adaptativos que se manifiesta en los conocidos fenómenos de tolerancia/dependencia. En un principio se pensaba que estos mecanismos actuaban a nivel del receptor e implicaban su fosforilación por varias clases de GRKs (*G-protein coupled Receptor kinases*). Actualmente se ha ampliado la idea de regulación a nivel de las proteínas transductoras G, así como de proteínas que modulan su función, como las RGS (*Regulator of G-protein Signaling*) que regulan la función de la subunidad $G\alpha$ por activación de la actividad GTPasa intrínseca de estas subunidades, o la fosducina y proteínas tipo fosducina, las cuales condicionan la capacidad de las subunidades $G\beta\gamma$ libres para unirse a diferentes efectores y también a las subunidades $G\alpha$.

Entre los diferentes efectores regulados por las proteínas G se encuentra la fosfolipasa C y su quinasa asociada, la PKC (*proteín kinase C*) que parece estar implicada en los fenómenos de tolerancia, puesto que sus activadores elevan la fosforilación del receptor tipo μ , mientras que los inhibidores reducen el efecto de la quinasa (*Gucker y Bidlack, 1992; Ueda y col., 1995; Zhang y col., 1996*). La PKC es capaz de modular *in vitro* varios pasos del sistema de transducción adenilato ciclasa/AMP cíclico/proteína quinasa A, como la regulación de la fosforilación e inactivación funcional de las proteínas G_i (*Strassheim y Malbon, 1994*), con el consecuente aumento de la actividad de la adenilato ciclasa (*Yoshimasa y col., 1987*).

Además, algunos estudios revelan que la proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA) (*Harada y col., 1990*), proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina de tipo II (CaMKII) (*Koch y col., 1997*) y quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (*Pei y col., 1995; Zhang y col., 1998*) ejercen un importante papel en la fosforilación del receptor opioide. Pero son los mecanismos mediados por PKC y GRK los que parecen ser claves para el desarrollo de la desensibilización e internalización del receptor opioide (*Zhang y col., 1996, 1998*).

En una primera fase, el trabajo de investigación se centró en determinar el efecto de la administración crónica de morfina sobre los niveles de las diferentes PKCs así como la evolución de los posibles cambios durante la abstinencia hasta la recuperación de la respuesta normal a los opiáceos.

2.1.- Efecto del tratamiento crónico de morfina sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratón.

La PKC es una familia de serina/treonina quinasas abundantes en el cerebro, que tras su activación se translocan desde el citosol a la membrana. Con el fin de determinar el efecto de la administración crónica de morfina sobre los niveles de las diferentes PKCs así como la evolución de los posibles cambios durante la abstinencia hasta la recuperación de la respuesta normal a los opiáceos, estudiamos la fracción citosólica y de membrana de la corteza cerebral de ratones a los que se implantó 10mL/Kg de una suspensión oleosa que contiene 0,1g/mL de morfina.

En base a la respuesta analgésica y como se ha descrito en el apartado anterior, se eligieron los tiempos en los que realizamos este estudio, uno en el que el animal es tolerante a la morfina, que coincide con las 24 horas después de iniciar el tratamiento con el opioide, y otro en el que los animales recuperan la respuesta con respecto a los controles (7 días después de la implantación de la suspensión oleosa). Estas preparaciones fueron resueltas por SDS-PAGE y transferencia a membranas de PVDF, cuantificándose la señal obtenida en un densitómetro óptico GS-700 y el programa *Molecular Analyst (v 1.5) (BioRad)*.

En ambas fracciones, los anticuerpos revelaron proteínas inmunorreactivas de pesos moleculares de ~80kDa para PKC α , PKC β (β I y β II), y PKC γ y de 90kDa para PKC ϵ (Figura 17).

Después de 24 horas de tratamiento crónico con morfina, la intensidad de la inmunorreactividad de la PKC α en la fracción citosólica de la corteza cerebral de ratón fue un 26 \pm 4% mayor que en los controles mientras que en los niveles de PKC γ , PKC β I, PKC β II y la PKC ϵ se produce una disminución de los niveles de un 19 \pm 3%, 35 \pm 6%, 22 \pm 4% y 15 \pm 7%, respectivamente (Tabla 3; Figura 17).

En ratones abstinentes (7 días después de la implantación de la suspensión con morfina), en los que se observa una recuperación de la respuesta analgésica a la morfina con respecto a los ratones control, persisten los cambios en los niveles de PKC α , pero en este caso, disminuyeron un 35 \pm 5% y hasta un 57 \pm 8% y 39 \pm 7% de PKC γ y PKC ϵ , siendo los niveles de PKC β I y PKC β II similares a los obtenidos en los animales control.

En la fracción de membrana se observó una tendencia de aumento de los niveles de PKC α , PKC β I, PKC γ y PKC ϵ , o de disminución en los niveles de PKC β II. Sin embargo, estos valores no fueron significativamente estadísticos. Esto es debido a que la cantidad de PKC que se trasloca del citosol a la membrana en respuesta a la morfina crónica constituye una fracción minoritaria del total asociado a la membrana plasmática celular (Huang y col., 1987). En ratones abstinentes, los niveles de todas las PKCs fueron similares a los animales control (Tabla 3).

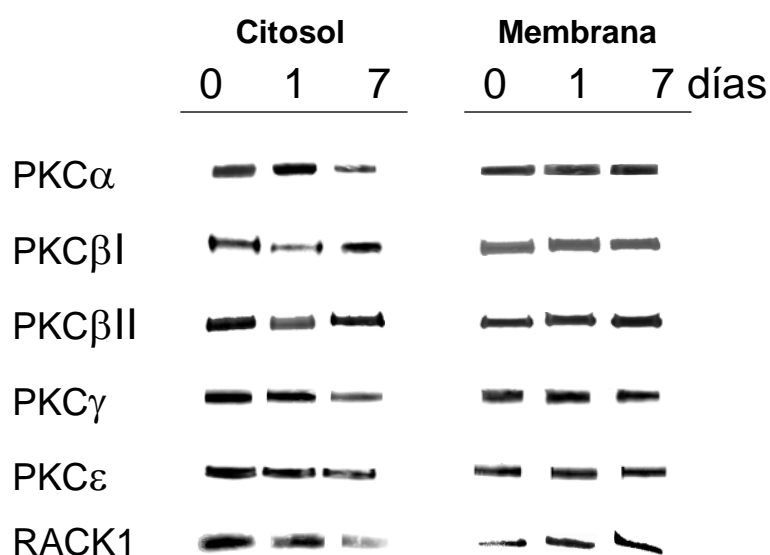
La interacción de la PKC con la membrana parece más compleja que la mera unión del enzima con alguno de sus lípidos y se ha descrito la existencia de proteínas, los receptores de PKC activada (RACK- *receptor for activated C-kinases*), que se unen a la quinasa de forma dependiente de fosfolípidos y podrían influir en la interacción, proporcionando especificidad a la misma. Por ello, en el estudio se ha incluido la RACK-1 que parece relacionarse con su translocación a la fracción de membrana.

El anticuerpo anti-RACK-1 mostró una banda inmunorreactiva de 36 kDa en la fracción citosólica y de membrana de la corteza cerebral de ratón. Esta proteína parece sufrir una regulación a la baja (*down-regulation*) en citosol a las 24 horas y 7 días de comenzar el tratamiento crónico con morfina, disminuyendo las señales un 30 \pm 5% y un 74 \pm 10% respectivamente, y aumenta en la fracción de membrana de la corteza cerebral de ratones tolerante/dependientes y abstinentes (Tabla 3; Figura 17).

% Cambio de la inmunorreactividad de PKCs y RACK-1				
PKC (RACK-1)	Citosol		Membrana (P2)	
	1	7 días	1	7 días

PKCα	26 \pm 4*	-35 \pm 5*	11 \pm 4	-5 \pm 6
PKCβI	-35 \pm 6*	-5 \pm 6	10 \pm 7	12 \pm 6
PKCβII	-22 \pm 4*	-11 \pm 5	-7 \pm 3	12 \pm 5
PKCγ	-19 \pm 3*	-57 \pm 8*	10 \pm 5	3 \pm 2
PKCϵ	-15 \pm 7	-39 \pm 7*	15 \pm 6	17 \pm 6
RACK-1	-30 \pm 5*	-74 \pm 10*	40 \pm 6*	80 \pm 11*

Tabla 3. Variaciones de la inmunorreactividad de PKCs y RACK-1 en la corteza cerebral de ratones tolerante/dependientes (24 horas después de la administración s.c. de una suspensión oleosa de morfina) y abstinentes con respuesta normal a opioides (7 días tras la implantación del opioide). A partir de la corteza cerebral de 5 ratones se prepararon las fracciones de citosol y membrana que fueron solubilizadas para su análisis por SDS-PAGE y transferencia a PVDF. Las bandas inmunorreactivas fueron analizadas por densitometría óptica. Los valores son la media \pm E.S.M de tres experimentos independientes. * Diferencias significativas con respecto al grupo control que fue implantado con una suspensión oleosa sin el opioide. ANOVA, test Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$. Experimentos representativos de la inmunodetección de estas proteínas son mostrados en la figura 17.



2.2.- Efecto del tratamiento crónico de deltorfina II sobre los niveles de las diferentes PKCs en la corteza cerebral de ratones knock-out del receptor opioide μ .

Mediante el empleo de técnicas de recombinación homóloga, se han conseguido ratones mutantes (*knock-out*) en los que se han suprimido los genes responsables de la expresión de cada uno de los receptores opioideos μ , delta y kapa. Su utilización ha permitido importantes avances en el conocimiento de los mecanismos implicados en las respuestas analgésicas y los fenómenos de dependencia inducidos por los opiáceos (*Matthes y col., 1996*).

Nosotros pudimos disponer de las estructuras del S.N.C. de ratones mutantes deficientes en el receptor opioide μ , que han recibido un tratamiento crónico con un agonista opioide selectivo del receptor δ , la deltorfina II, generosamente cedidas por el Dr R. Maldonado del Laboratorio de Neurofarmacología de la Facultad de Ciencias de la Salud y la Vida de la Universidad Pompeu Fabra de Barcelona.

La disponibilidad de estos ratones modificados genéticamente que han recibido un tratamiento crónico con un agonista δ , aporta un modelo de estudio a nivel comportamental y bioquímico, del desarrollo de la dependencia física en un modelo animal carente del receptor opioide μ (*Maldonado y col., 2001*).

Figura 17. Inmunodetección de PKCs y RACK-1 en la corteza cerebral de ratones tolerante/dependientes y abstinentes a morfina. En el día 0 se muestran las inmunoseñales correspondientes a los animales que recibieron vía s.c. la suspensión oleosa sin morfina (placebo). En el día 1 las procedentes de animales tolerante/dependientes que han sido inyectados (24 h antes del análisis) con la suspensión oleosa de morfina, y en el 7º día se muestran las señales obtenidas con los animales que han recibido el tratamiento de morfina y que muestran en este intervalo, después de la inyección s.c. de la suspensión oleosa, una respuesta analgésica normal a morfina y que no presentan la dependencia física a una dosis de naloxona. 80 μ g de proteína de la fase soluble (citósol) o de la fracción de membrana (P2) fueron cargados por calle en geles de un 8-16% de poliacrilamida/2,6% bis-acrilamida.

En este sentido, considerando que los agonistas del receptor delta producen una dependencia física moderada, menor que la inducida con el tratamiento

crónico de un agonista μ (Cowan y col., 1988; Maldonado y col., 1990), se diseñó un estudio en el que de forma análoga al apartado anterior, se analizara a nivel bioquímico este fenómeno, midiendo en ratones *knock-out* del receptor μ los niveles de varias isoenzimas de PKCs, las cuales, se asocian con el desarrollo de tolerancia y dependencia a los opioides que actúan a través de este receptor (Narita et al., 1995; Fundytus y Coderre, 1996), y analizar así, la participación de estos receptores en el desarrollo de la dependencia opioide.

Los niveles de PKCs fueron determinados en ratones *wild-type* (que presentan el genotipo salvaje) y *knock-out* del receptor opioide μ a los que se les ha administrado una dosis aguda de naloxona al 6° día de iniciar el tratamiento crónico con salino o deltorfina II. Inmediatamente después los animales fueron sacrificados por decapitación, extrayéndose la corteza cerebral a partir de la cuál se prepararon las fracciones de citosol y membrana que fueron analizadas por SDS-PAGE transferidas a una membrana de PVDF y reconocidas con un anticuerpo específico.

En ambas fracciones los anticuerpos revelaron proteínas inmunorreactivas a pesos moleculares de ~80kDa para PKC α , PKC β (I y II) y PKC γ . En la fracción citosólica procedente de ratones *knock-out* y *wild-type* no se observaron variaciones significativas de los niveles de las distintas PKCs inducidos por el salino. Sin embargo, en animales *wild-type* aparecen diferencias en los niveles de las PKCs después del tratamiento con deltorfina II, observándose un aumento significativo de la inmunoseñal asociada a PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ en la fracción soluble de la corteza cerebral. Los valores aparecen representados en la Tabla 4. En contraste, el tratamiento crónico con el péptido opioide no cambió los niveles de las PKCs en ratones *knock-out* del receptor opioide μ .

Al igual que en los ensayos anteriores en los que se administró la suspensión oleosa de morfina a ratones, los niveles de las distintas PKCs en ratones *knock-out* abstinentes, fueron similares a los animales control (Tabla 4).

% Cambio de la inmunoreactividad de PKC		
PKC	Citosol	
	+/+	-/-
PKC α	57 \pm 6*	-5 \pm 2
PKC β I	92 \pm 8*	-10 \pm 4
PKC β II	122 \pm 10*	-7 \pm 3
PKC γ	35 \pm 4*	10 \pm 3

Tabla 4. Efecto del tratamiento crónico con deltorfina II sobre los niveles de PKCs en la corteza cerebral de ratones control o *wild-type* (+/+) y ratones carentes en el receptor opioide μ o *knock-out* (-/-). Los ratones recibieron un tratamiento crónico con salino o deltorfina (10 μ g/h en 1 μ l i.c.v. durante 6 días), y fueron decapitados después de la administración de una dosis de naloxona (3mg/kg, s.c.) y la posterior evaluación del síndrome de abstinencia. Para cada determinación la corteza cerebral de 5 ratones se fraccionó para obtener la fracción soluble (citosol), que se solubilizó para su análisis por SDS-PAGE y transferencia a PVDF (80 μ g de proteína/calle). La detección con anticuerpos específicos fue cuantificada por densitometría óptica. Los valores son la media \pm E.S.M. de cuatro experimentos. * Diferencias significativas con respecto al grupo que recibió el salino. ANOVA, test Student-Newman-Keuls (P < 0,05). Los experimentos representativos de la inmunodetección de estas proteínas en el citosol son mostrados en la figura 18.

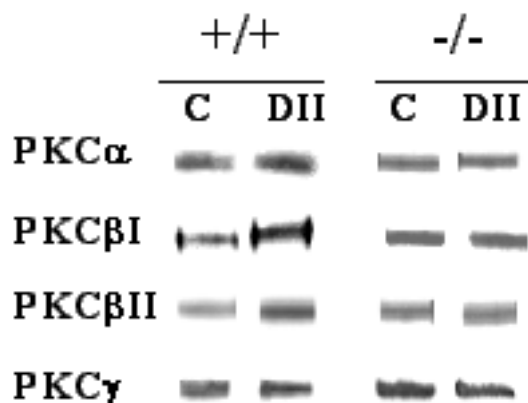


Figura 18. Inmunodetección de PKCs en la corteza cerebral de ratones carentes en el receptor opioide μ (*knock-out*), que han recibido tratamiento crónico con deltorfina II. (+/+) corresponde a las inmunoseñales de ratones control o *wild-type* y (-/-) a ratones *knock-out* del receptor opioide μ . Se observaron bandas inmunorreactivas de ~80 kDa para PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ , que corresponden con el peso molecular descrito. Las señales fueron detectadas mediante un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidasa, tras la adición del sustrato 3,3'-diaminobencidina.

3.-Estudio de las proteínas moduladoras de la función de las proteínas G.

Se ha demostrado que el proceso de desensibilización de los receptores opiodes actúa también a nivel de las proteínas transductoras G, produciéndose adaptaciones en el estado funcional o disponibilidad de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ y de varias proteínas conocidas por modular su función. Las proteínas que comparten el dominio RGS, se une a las subunidades $G\alpha$ -GTP activas capaces de regular efectores, para acelerar el metabolismo a $G\alpha$ -GDP (inactivación) y forzar su retorno a la regulación receptorial. Las proteínas tipo fosducina regulan la función de las proteínas G al unirse a las subunidades $G\beta\gamma$ libres para evitar la acción de quinasas específicas de receptor (GRKs) y también prevenir la señalización que sobre efectores específicos realizan los dímeros $G\beta\gamma$.

En una segunda fase del trabajo se evaluó la importancia de estas proteínas reguladoras en efectos comportamentales mediados por un receptor G, el receptor opioide, así como su participación en los procesos de desensibilización de este receptor, principalmente la tolerancia a corto plazo o taquifilaxia.

3.1.- Estudio de las proteínas RGS (Regulator of G-protein Signaling) en el S.N.C. de ratón.

3.1.1.- Implicación de las RGS en la analgesia inducida por morfina.

Se analizó el papel en la respuesta analgésica mediada por el receptor opioide μ de diferentes subtipos de RGS, cuya presencia ha sido descrito en S.N.C. (*DeVries y col., 2000; y referencias citadas*). El efecto antinociceptivo supraespinal producido por la administración i.c.v. de una dosis de 3 nmol por ratón de morfina, fue establecido mediante el test de *tail-flick* a los 30 y 90 minutos después de la inyección. Estos intervalos de tiempo corresponden a la aparición del pico de máximo efecto analgésico y a un tiempo en el que se reduce la potencia analgésica a la mitad, respectivamente. En la figura 19 aparecen representados estos efectos con una línea discontinua.

Una vez obtenidas las respuestas basales de los animales frente al estímulo

nociceptivo térmico, con un valor medio de $1,6 \pm 0,1$ segundos ($n=10$), los ratones se distribuyeron, para cada intervalo de medida (30 y 90 minutos) en quince grupos homogéneos que fueron los siguientes:

- ▶ un grupo de animales control a los que se les administró i.c.v. el vehículo salino para valorar el posible efecto sobre la analgesia de las inyecciones
- ▶ un segundo grupo que recibió un oligodeoxinucleótido aleatorio o *random* (ODN-RD) para evaluar los posibles efectos tóxicos y/o variaciones de la analgesia producidas por la administración de nucleótidos sulfotionados y finalmente, se incluyeron
- ▶ trece grupos que fueron inyectados con los ODNs frente a las secuencias de nucleótidos del ARNm que codifica distintas RGS:
 - ▶▶ tres grupos cada uno de los cuales recibieron un ODN frente a distintas secuencias del ARNm que codifica la síntesis de la RGS2 (ODN₄₂₈₋₄₄₃, ODN₇₄₃₋₇₅₈ y ODN₁₂₁₁₋₁₂₂₇)
 - ▶▶ un grupo que recibió un ODN₁₀₅₋₁₂₀ frente a la secuencia de nucleótidos del 105-120 del ARNm de la RGS3
 - ▶▶ un grupo que recibió un ODN₃₁₀₋₃₂₆ dirigido al ARNm de la RGS4
 - ▶▶ un grupo tratado con el ODN₃₈₉₋₄₀₄ frente a la RGS5
 - ▶▶ otro grupo de ratones a los que se les administró un ODN₁₃₈₁₋₁₃₉₇ para bloquear la síntesis de la RGS7
 - ▶▶ tres grupos que recibieron un ODN frente a distintas secuencias del ARNm de la RGS9-2 (ODN₅₃₂₋₅₄₇, ODN₉₇₃₋₉₇₈ y ODN₁₂₃₄₋₁₂₄₉)

- y tres grupos que recibieron el ODN₁₆₅₋₁₈₀, ODN₄₃₁₋₄₄₆ o el ODN₈₃₂₋₈₅₀ dirigidos a reducir la expresión de la RGS12, RGS14 y RGS16, respectivamente.

El tratamiento con los ODNs seleccionados para este estudio no alteró la latencia basal de los animales al estímulo nociceptivo térmico. La disminución de la síntesis de las proteínas RGS4, RGS7, RGS9-2, RGS12, RGS14 o RGS16, con los distintos ODNs, incrementó la amplitud y duración de la antinocicepción inducida por la morfina, mientras que en los animales con una expresión reducida de RGS2 y RGS3 se observa una disminución de estos parámetros. La mejora de la actividad opioide es aún más pronunciada cuando disminuye la actividad analgésica a los 90 minutos después de la inyección del opioide. El ODN frente a la RGS5 no cambió el perfil analgésico mostrado por la morfina.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos, pudiendo establecerse que algunas RGS liberan rápidamente $G\alpha$ -GDP para reconstituir con $G\beta\gamma$ las G triméricas, como RGS2 o RGS3, mientras que las otras RGS analizadas en el estudio, excepto la RGS5, retrasan el retorno de $G\alpha$ -GDP, lo que produce una disminución progresiva del efecto agonista.

Este estudio ponen de manifiesto que según el tipo de proteína RGS de que se trate se puede modular en una u otra dirección la duración y amplitud de la respuesta fisis/farmacológica mediada por el receptor opioide μ . En base a los resultados obtenidos en analgesia y con el fin de analizar su participación en los procesos de desensibilización de este receptor (taquifilaxia y tolerancia crónica), se seleccionaron dos de estas proteínas reguladoras de la función de la proteína G: la RGS2 y RGS9, que ejercen acciones opuestas sobre la antinocicepción opioide. En este sentido, la RGS2 disminuye la potencia analgésica a morfina, mientras que la RGS9 la aumenta.

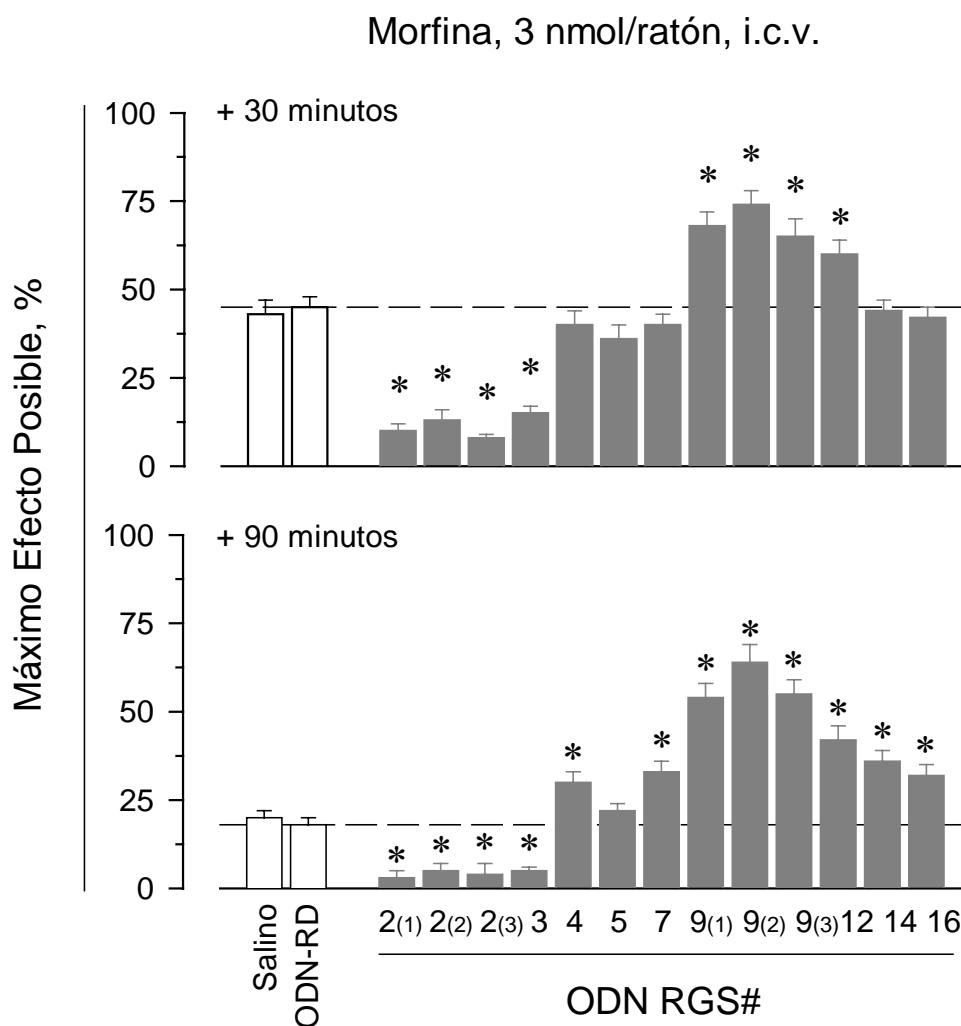


Figura 19. Efecto de la administración subcrónica de los ODNs frente a distintas RGS sobre la analgesia supraespalinal inducida por el opioide agonista morfina (3 nmol/ratón) a los 30 y 90 minutos de su inyección i.c.v.. Con cada ODN se utilizó un grupo diferente de 10 ratones y se llevaron dos grupos control que recibieron el vehículo salino o el ODN-RD. La respuesta antinociceptiva se expresa como el % MEP. Los valores son la media \pm E.S.M. de cada grupo. * Diferencias significativas con respecto a los controles. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

3.1.2.- Presencia y distribución de RGS2 y RGS9-2 en diferentes áreas del S.N.C. de ratón. Eficacia y selectividad de los ODNs.

La eficacia y selectividad de los tratamientos con los ODNs fue analizada con anticuerpos dirigidos a las proteínas RGS2 y RGS9, al mismo tiempo que confirmamos la presencia y distribución de estas proteínas en las distintas estructuras del S.N.C. de ratón.

Tras el tratamiento subcrónico con el ODN específico, los animales fueron sacrificados, extrayéndose las distintas estructuras cerebrales: corteza cerebral, estriado y SGPA sobre las que realizamos el estudio de inmunodetección. Los grupos controles recibieron las correspondientes inyecciones con los ODN-*mismatch* de cada uno de los ODNs empleados en el estudio. Las estructuras procedentes de 4 ratones se procesaron para obtener las fracciones de membrana (P₂) que fueron resueltas por SDS-PAGE y transferidas a un soporte sólido (*blot*), para su reconocimiento con los anticuerpos específicos anti-RGS2 y anti-RGS9-2 (*Western Blotting*).

La inmunodetección reveló una proteína de ~ 28 kDa para RGS2 (*Heximer y col., 1997*) y de ~ 77 kDa para RGS9-2, respectivamente (*Rahman y col., 1999*), en todas las estructuras analizadas, demostrando así su presencia y distribución en el S.N.C. de ratón. La cuantificación de la intensidad de las señales por densitometría, en animales control, revela una mayor presencia de la proteína RGS9-2 en estriado que en corteza cerebral o SGPA en los ratones CD-1 empleados en el estudio. De la misma manera, RGS2 es más abundante en estriado y corteza cerebral que en la SGPA (Figura 20).

En las estructuras procedentes de animales tratados con el ODN frente a la RGS2, se observó una disminución significativa en el inmunomarcaje de la RGS2 con respecto al grupo de animales control. En la figura 20 se presentan los datos correspondientes al ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2 frente al control (con el ODN-*mismatch*). Los porcentajes de disminución fueron de 55±5* en el estriado, 44±4* en la corteza cerebral y 51±5* en la SGPA.

Los tres ODNs frente a la RGS9-2 condujeron a descensos similares de la inmunorreactividad asociada a esta proteína. Los porcentajes de disminución del ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9-2 frente al *mismatch* fueron: $40 \pm 4^*$ para el estriado, $60 \pm 5^*$ para la corteza cerebral y $48 \pm 5^*$ para la SGPA (los valores son la media \pm E.S.M. de tres experimentos independientes; * indica diferencias significativas respecto al grupo control inyectado con el ODN-*mismatch*; $P < 0,05$, ANOVA, Student-Newman-Keuls). El tratamiento con los ODNs *mismatch*: ODNs-RGS2M o ODNs-RGS9-2M no alteró la inmunorreactividad asociada a RGS2 o RGS9-2.

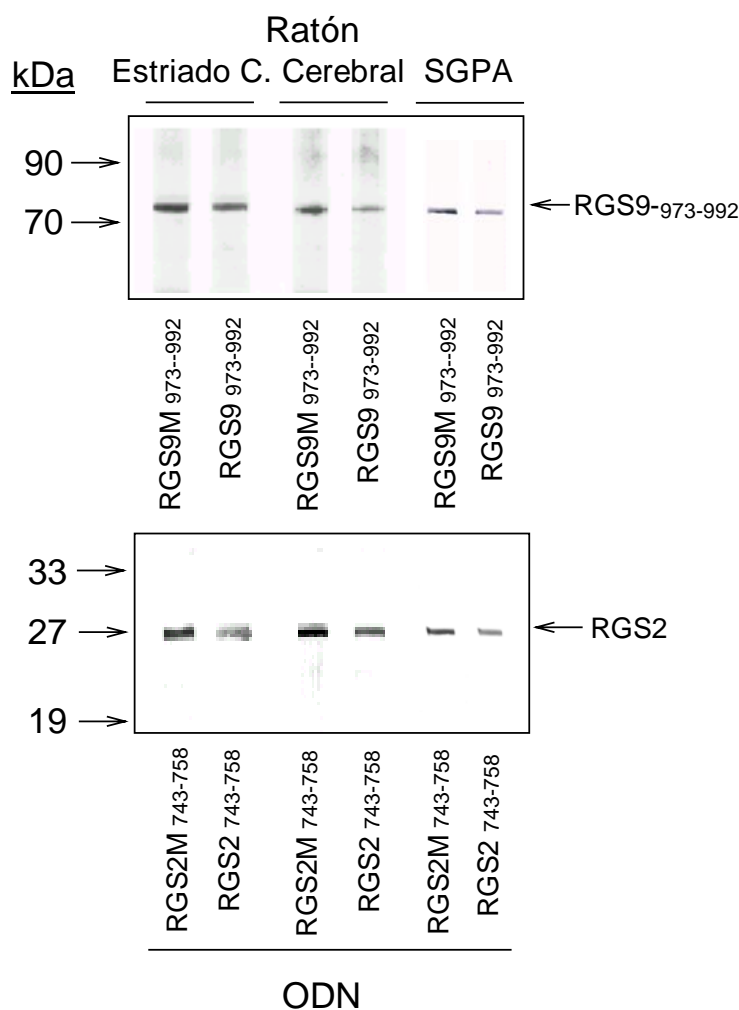


Figura 20. Inmunodetección de RGS9-2 y RGS2 en estructuras de cerebro de ratón. Para RGS9-2 se cargaron por calle 45, 60 y 80 μ g de proteína procedente de membranas P_2 de estriado, sustancia gris periacueductal (SGPA) y corteza cerebral de ratón, que fueron analizadas en geles de 10-20% acrilamida/2,6% bisacrilamida. De la misma manera, para el análisis de la RGS2 60 μ g de proteína de membranas P_2 de cada una de las estructuras fueron analizadas por calle. Además, la eficacia del tratamiento con el ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2 y ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9-2 fue comprobada con los anticuerpos específicos de cada proteína.

En los animales *knock-down* de RGS2 o RGS9-2 tampoco se alteró la expresión de otras proteínas implicadas en la señalización celular, como son las subunidades $G\beta_{1/2}$ y la $G\alpha_{i2}$ o el receptor opioide μ (Figura 21).

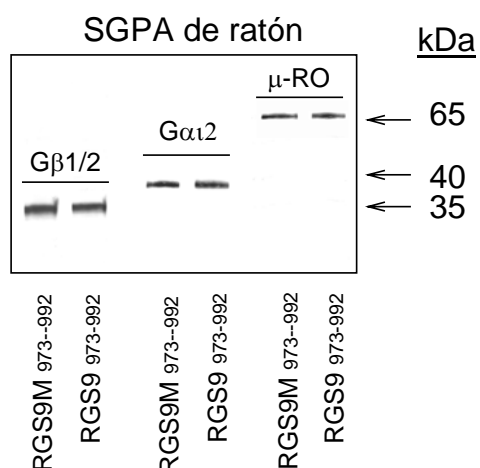


Figura 21. La selectividad del tratamiento con el $ODN_{743-758}$ -RGS2 y $ODN_{973-992}$ -RGS9-2 se comprobó con anticuerpos frente a las subunidades $G\beta_{1/2}$, $G\alpha_{i2}$ y receptor opioide mu (μ -RO). 60 μ g de proteína de membranas P_2 de la SGPA de ratón fueron solubilizados con SDS y resueltos en geles de 10-20% acrilamida/2,6% bisacrilamida.

3.1.3.- Efecto de la RGS2 y RGS9-2 en la tolerancia aguda inducida por morfina.

Con la finalidad de investigar la influencia de las proteínas RGS2 y RGS9-2 en la tolerancia aguda opioide, se administró una dosis de morfina a cuatro grupos de animales que han recibido el tratamiento con el $ODN_{973-978}$ -RGS9-2, el $ODN_{743-758}$ -RGS2 o sus correspondientes *mismatch*: $ODN_{973-978}$ -*mismatch*-RGS9-2 y $ODN_{743-758}$ -*mismatch*-RGS2.

Debido a que el tratamiento con el ODN dirigido a bloquear la síntesis de la RGS2 produce una disminución de la potencia analgésica inducida por una dosis de morfina de 3 nmol/ratón respecto al tratamiento con el $ODN_{973-978}$ -RGS9-2 (Figura 19), se administró, a cada grupo, una dosis de morfina capaz de producir un efecto analgésico comparable del orden del 80% sobre la basal.

De esta manera, los animales recibieron el vehículo salino (control) o la morfina (10 nmol/ratón en el grupo tratado con el ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9-2, ó 30 nmol/ratón si recibieron el ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2) y a las 24 horas se evaluó la analgesia inducida por una segunda dosis de opioide. En los animales tratados con el ODN₉₇₃₋₉₇₈-*mismatch*-RGS9-2, la potencia analgésica alcanzó valores de 76±5% y 34±4% del máximo efecto posible (n=12) en animales control y animales pretratados 24 horas con una primera dosis de morfina, respectivamente. Sin embargo, la potencia analgésica del opioide no se redujo en los animales *knock-down* de RGS9-2, registrándose incrementos en el tiempo de reacción sobre la basal semejantes a los del grupo control, con un valor del orden de 70% en el pico de máximo efecto analgésico (Figura 22A). En estos animales, tampoco se observaron variaciones de la analgesia en el transcurso del tiempo después de la administración de la primera dosis de morfina (Figura 22B).

Por el contrario, la disminución de la síntesis de la RGS2, con su correspondiente ODN, no supone un papel protector contra la tolerancia aguda inducida por la administración de 30 nmol/ratón de morfina, observándose una disminución de la respuesta analgésica similar a los animales tratados con el ODN₇₄₃₋₇₅₈-*mismatch*-RGS2, que recibieron una primera dosis del opioide capaz de producir tolerancia aguda en el ratón (10 nmol) y una segunda dosis, a las 24 horas, que nos permitió evaluar este fenómeno.

Se concluye que la RGS9-2 es particularmente responsable de la aparición de taquifilaxia o tolerancia aguda (*Garzón y col., 2001*), al desensibilizar la vía de señalización por el secuestro de las subunidades G α -GTP activadas por receptor, lo que retrasa su reasociación con dímeros G $\beta\gamma$ y dan lugar a un descenso en heterotrímeros funcionales G $\alpha\beta\gamma$. Por tanto, nuestros resultados indican que los mecanismos responsables de este fenómeno se localizan a nivel de las proteínas G y su regulación. La potenciación experimental del tono funcional de las proteínas G, o la depresión de ciertos reguladores negativos, como la RGS9-2, puede constituir una vía de actuación para optimizar y controlar de forma efectiva los efectos agonistas, en este caso la producción de analgesia opiácea.

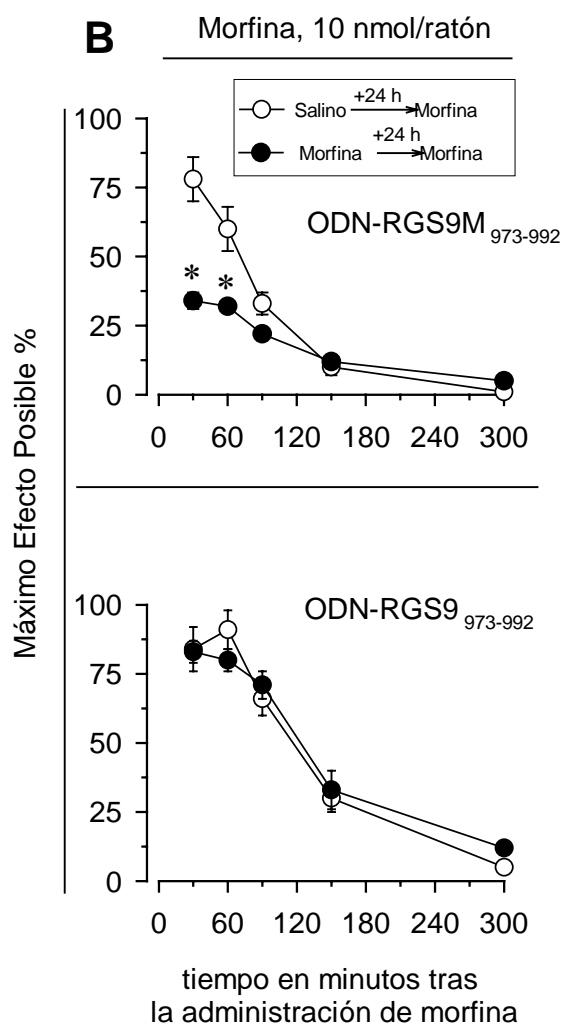
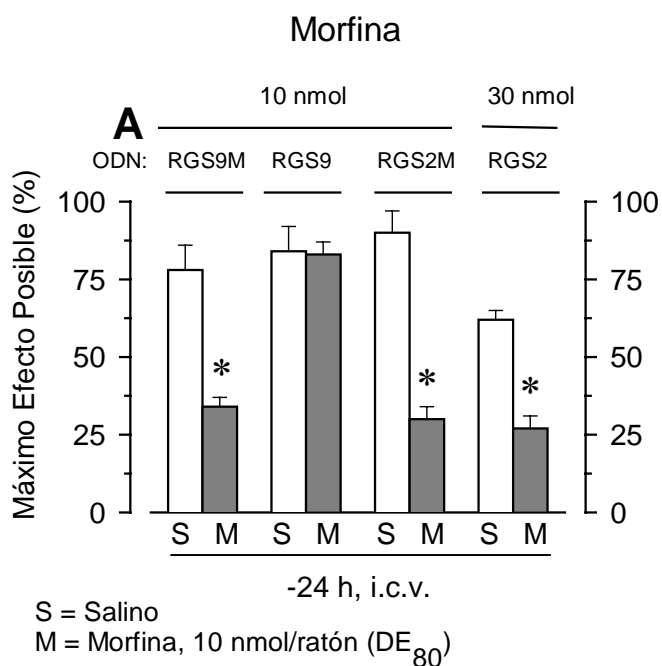


Figura 22. (A) Efecto de la RGS9(2) y RGS2 en la tolerancia aguda inducida por morfina. El efecto analgésico del opioide fue medido 30 minutos después de su administración i.c.v. en distintos grupos de animales pretratados con los ODN-RGS: ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9(2), ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2 y sus correspondientes controles (*mismatch*), que habían recibido 24 horas antes, el vehículo salino o una dosis de morfina de 10 nmol (o 30 nmol para el grupo tratado con el ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2), capaz de producir tolerancia aguda en el ratón.

(B) Evaluación temporal del efecto analgésico producido por una segunda dosis de morfina (10 nmol/ratón) en animales *knock-down* de RGS9(2) tratados 24 horas antes con el vehículo salino o una primera dosis de morfina de 10 nmol/ratón. Cada punto es la media \pm E.S.M. de los valores obtenidos en grupos de 10-20 ratones. * Diferencias significativas con el grupo inyectado con salino antes de la segunda dosis del opioide. El análisis estadístico aplicado fue el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

3.1.4.- Efecto de la RGS2 y RGS9-2 en la tolerancia crónica a morfina.

En nuestro modelo de tratamiento crónico de morfina, la disminución de la proteína RGS9-2 incrementa la respuesta inducida por el opioide, durante las 2-3 horas siguientes a la implantación s.c. de la suspensión oleosa del opioide, respecto al grupo que recibió su correspondiente ODN-*mismatch*. Por el contrario, una disminución de la actividad analgésica se observó, en este mismo período, en los ratones *knock-down* de RGS2 (Figura 23A) si se compara con su grupo control que fue inyectado con el ODN₇₄₃₋₇₅₈-*mismatch*-RGS2.

Transcurridas 18 horas de la implantación de la suspensión oleosa del opioide, no se observaron variaciones en la potencia analgésica de una dosis i.c.v. de morfina en ninguno de los grupos empleados en el estudio (Figura 23B).

Podemos concluir por tanto, que varias horas después de comenzar el tratamiento crónico con morfina, los efectos beneficiosos de la disminución de la RGS9-2 desaparecen, desarrollándose la tolerancia, debido a que para reducir el impacto de la morfina crónica sobre el receptor opioide, otras proteínas RGS pueden

sustituir la función GAP (*GTPase activating protein*) que sobre subunidades $G\alpha$ -GTP activas ejerce la RGS9.

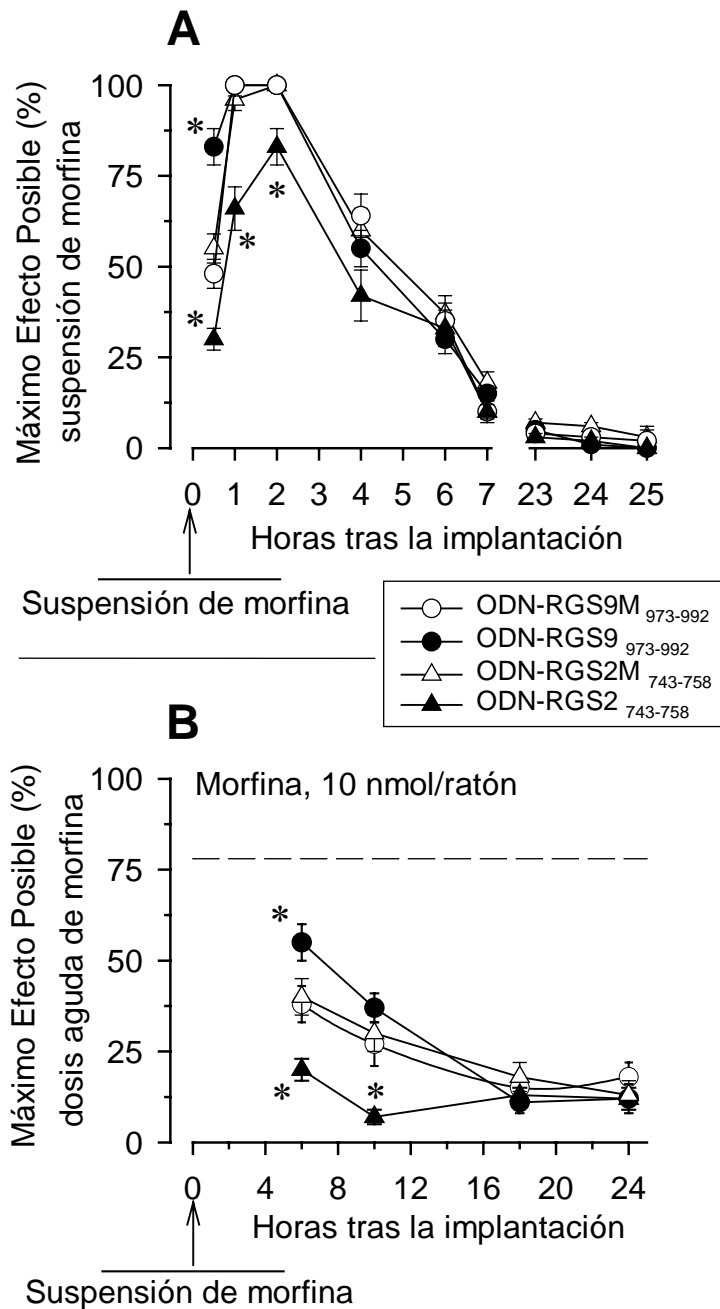


Figura 23. Efecto de la administración subcrónica del ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9(2) y ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2 sobre la analgesia suraespinal inducida por morfina en ratones sometidos a tratamiento crónico con el opioide. Se llevaron cuatro grupos en paralelo, uno que recibió

el ODN₉₇₃₋₉₇₈-RGS9(2) y su correspondiente control tratado con el ODN-*mismatch*, el que recibió el ODN₇₄₃₋₇₅₈-RGS2 y el tratado con el ODN₇₄₃₋₇₅₈-*mismatch*-RGS2. Al finalizar el tratamiento con el ODN, los ratones se distribuyeron en varios grupos y fueron implantados (a tiempo 0) con una suspensión oleosa de morfina. (A) Medida del efecto analgésico del opioide liberado de la suspensión, a distintos tiempos. (B) Evaluación del efecto analgésico, a distintos intervalos, de una dosis i.c.v. de 10 nmol de morfina que induce un efecto analgésico del 80% sobre el MEP en ratones tratados únicamente con esta dosis del opioide (representado en la gráfica con una línea discontinua), midiéndose la respuesta antinociceptiva a los 30 min de su administración. Los valores son la media \pm E.S.M. de cada grupo. * Diferencias significativas con respecto a los controles que recibieron el ODN-*mismatch*. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

3.2.- Presencia y distribución de G β 5 en diferentes áreas del S.N.C. de ratón.

Eficacia y selectividad del ODN- β ₅ 293-309.

Se ha descrito que G β 5 (39 kDa) sólo se expresa en cerebro de ratón (Watson y col., 1994), mientras que la variante larga (G β 5_L), que contiene 42 aminoácidos más en el extremo N-terminal, está limitada a la retina (Watson y col., 1996), donde forma un complejo con las RGS que presentan el dominio GGL (de *G protein γ -subunit-like*), RGS6, RGS7, RGS9 y RGS11 (Makino y col., 1999; Snow y col., 1999). A nivel celular, G β 5 se ha encontrado tanto en la fracción soluble como de membrana del cerebro de ratón (Watson y col., 1996).

En nuestro estudio, el análisis de membranas P₂ de distintas estructuras del S.N.C. de ratón, solubilizadas con SDS y analizadas por SDS/PAGE e inmunodetección con un anticuerpo policlonal anti- β ₅, reveló su presencia en corteza cerebral, estriado, SGPA, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal (Figura 24A).

Además, la eficacia del tratamiento con el ODN- β ₅ 293-309, dirigido a reducir la síntesis de esta proteína, fue demostrada con el mismo anticuerpo, observándose una

disminución significativa de la señal inmunorreactiva en el hipotálamo, SGPA y corteza cerebral de los ratones *knock-down* de $G\beta_5$ (Figura 24B).

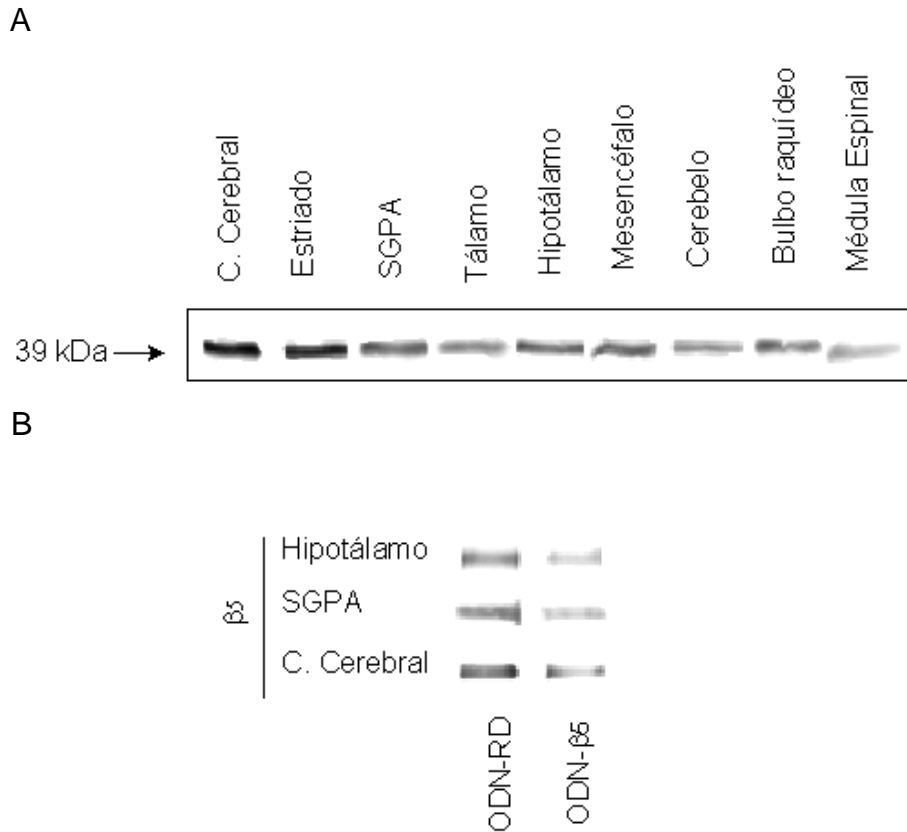


Figura 24. (A) Inmunodetección, con el anticuerpo anti- β_5 , sobre muestras de membranas P_2 de cerebro de distintas estructuras de cerebro de ratón. (B) Eficacia del tratamiento con el ODN- β_5 293-309 en membranas P_2 de estructuras cerebrales procedentes de animales tratados con este ODN y el control (ODN-RD). La proteína total por calle fue 45 μ g/ratón, resuelta en geles de 10-20% acrilamida/2,6% bisacrilamida.

3.2.1.- Implicación de $G\beta_5$ en la analgesia inducida por morfina.

Una vez comprobada la presencia de la $G\beta_5$ en el S.N.C. de ratón, y en concreto, en la SGPA, estructura en la que se localiza la gran mayoría de los receptores opioides que median la analgesia supraespinal, procedimos a estudiar la posible influencia sobre este parámetro funcional. Actualmente, aunque la interacción de $G\beta_5$ con las RGS está

bien establecida no se dispone de datos que apoyen el posible papel regulador, que sobre la RGS9, ejerce la $G\beta_5$.

El tratamiento subcrónico durante 5 días consecutivos en un grupo de ratones con dosis crecientes de un oligodeoxinucleótido antisentido frente a una secuencia específica de la proteína $G\beta_5$ (ODN- β_5 293-309), que reduce su síntesis, produjo un aumento de la potencia de la morfina, similar al que se observa con la disminución en la síntesis de la RGS9 (Figura 25). Como control llevamos un grupo de animales inyectados con un ODN de secuencia aleatoria (ODN-RD), para evaluar el posible efecto tóxico de la administración de nucleótidos sulfonados en el vehículo. El paralelismo observado con ambos tratamientos, hace suponer una regulación de $G\beta_5$ sobre la actividad GAP de la RGS.

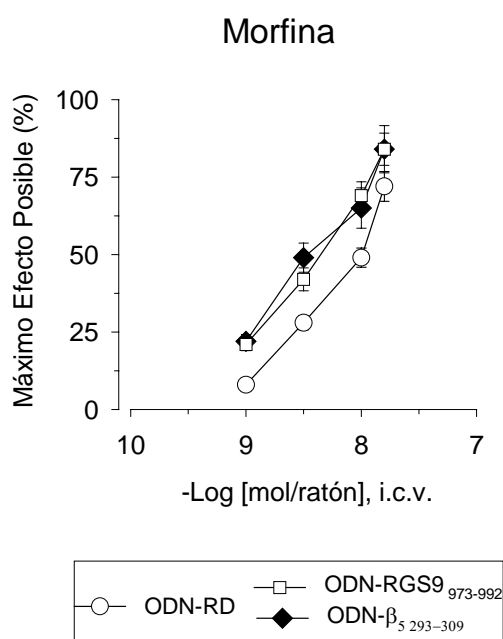


Figura 25. Tras el deterioro provocado por la administración del ODN- β_5 293-309, así como del ODN-RGS9₉₇₃₋₉₉₂, detectamos un aumento significativa en el efecto antinociceptivo de la morfina respecto al grupo control (ODN-RD). Los valores se expresan como las medias \pm E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. * Diferencias significativas con respecto a los controles que recibieron el ODN-RD y que se determinaron por análisis de la varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

3.2.2.- Efecto de $G\beta_5$ en la tolerancia aguda inducida por morfina.

Los datos anteriormente mostrados, nos llevaron a investigar el posible efecto de $G\beta_5$ sobre la tolerancia aguda inducida por morfina. La administración intracerebroventricular de una dosis de 10 nmol/ratón (DE_{80}) en los grupos de animales control (ODN-RD), es capaz de producir tolerancia aguda en el ratón (reducción de la respuesta analgésica), que se observa con la administración, a las 24 horas, de una segunda dosis del opioide de 10 nmol/ratón. De la misma forma que el tratamiento con el ODN-RGS9₉₇₃₋₉₉₂ (apartado 3.1.3. de esta sección), el tratamiento con el ODN- β_5 ₂₉₃₋₃₀₉, revierte la tolerancia aguda inducida por la morfina (Figura 26).

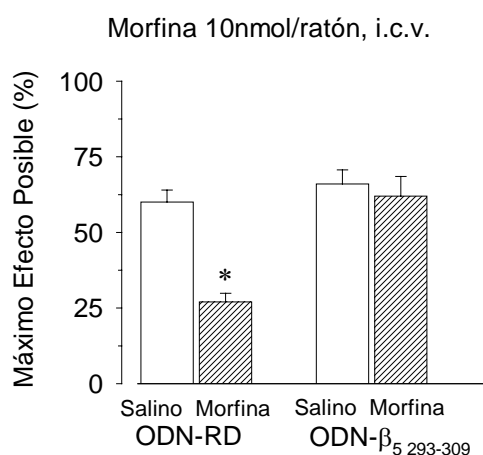


Figura 26. Efecto de $G\beta_5$ en la tolerancia aguda inducida por morfina. El efecto analgésico del opioide fue medido 30 minutos después de su administración i.c.v. en distintos grupos de animales pretratados con el ODN- β_5 ₂₉₃₋₃₀₉ y su correspondiente control (ODN-RD), que habían recibido 24 horas antes, el vehículo salino o una dosis de morfina de 10 nmol, capaz de producir tolerancia aguda en el ratón. * Diferencias significativas con el grupo inyectado con salino antes de la segunda dosis del opioide. El análisis estadístico aplicado fue el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

3.3.- Estudio de las proteínas tipo fosducina en el S.N.C. de ratón.

La fosducina (Phd) es una proteína citosólica presente en altas cantidades en la retina, con gran afinidad por el complejo $G\beta\gamma$ al cual se une, bloqueando la activación

de efectores inducida por la estimulación de las proteínas G en el sistema visual. Recientemente, se ha propuesto la existencia de unas proteínas homólogas, conocidas como tipo fosducina (*Phosducin-like proteins long and short*, PhLP_{L/S}) las cuales se expresan en cerebro y otros tejidos. La isoforma larga (PhLP_L), a diferencia de la corta (PhLP_S), contiene el dominio de unión a $\beta\gamma$ y el dominio de fosforilación por proteína quinasa A (Lee y col., 1990a; Miles y col., 1993; Craft y col., 1998). Por ello, nuestro objetivo fue caracterizar la PhLP_L, establecer su presencia y distribución en el cerebro de ratón, y analizar los posibles cambios adaptativos en respuesta al tratamiento agudo y crónico con opiáceos.

3.3.1.- Caracterización de PhLP_L en S.N.C. de rata y ratón.

3.3.1.1.- Distribución subcelular de inmunorreactividad tipo PhLP_L.

Desde el punto de vista de la localización subcelular, la información disponible es escasa, lo que nos llevo a estudiar los diferentes compartimentos celulares. Para ello, se procedió al fraccionamiento de la corteza cerebral de ratón que se homogeneizó en teflón-vidrio, rompiendo las membranas de la célula que inmediatamente se unen formando pequeñas vesículas cerradas, y mediante el método de centrifugación se procedió a separar los componentes celulares que son muy diferentes en tamaño.

En el caso de membranas P₂, el tejido homogeneizado se centrifugó a 1000 xg, 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 20 000xg, 20 min. El precipitado, que contiene las vesículas formadas al disgregar las membranas celulares (incluidas la membrana plasmática y las membranas del retículo endoplasmático), se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, para obtener una concentración final de proteína de 3 μ g/ μ l aproximadamente. El sobrenadante (S₂) así obtenido constituye la fracción citosólica de la que con la primera centrifugación se han eliminado por sedimentación los componentes de tamaño mayor, como son los núcleos y las células enteras (P₁). Para el fraccionamiento de los núcleos se procedió a su lisis con un medio hipotónico y centrifugación, precipitando, así, la membrana nuclear.

Resultados

El análisis electroforético y la inmunodetección de cada una de estas fracciones reveló bandas con un peso molecular de 45 kDa que corresponden a la PhLP_L glicosilada (Figura 27).

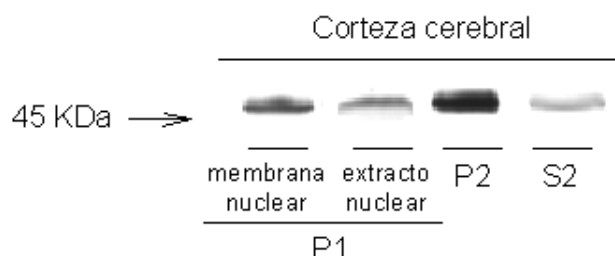
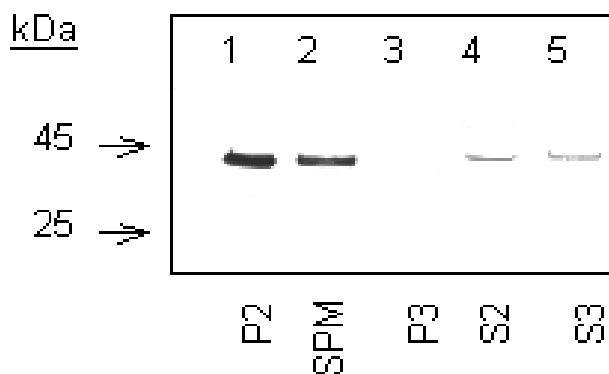


Figura 27. Inmunodetección con el anticuerpo anti-Phd/ PhLP_L de las distintas fracciones obtenidas por centrifugación de corteza cerebral de ratón. 90 µg de proteína de cada una de las fracciones fueron solubilizados con SDS y resueltos en geles de 10-20% acrilamida/2,6% bisacrilamida.

Sin embargo, el patrón de inmunorreactividad detectado no fue idéntico para las dos fracciones de ratón analizadas en cuanto a intensidad de las bandas (Figura 27). Así, profundizando más en este estudio se procedió a la lisis de la fracción P₂, donde se localiza la mayor parte de la PhLP_L celular, como se describe en Materiales y Métodos, y se la sometió a velocidades aún más altas durante un período de centrifugación más largo para obtener un precipitado que contiene las membranas plasmáticas sinápticas (*Sinaptic Plasmatic Membranes*). El sobrenadante (S₂) también se sometió a altas velocidades de centrifugación obteniéndose una fracción P₃ de membranas microsomales y un sobrenadante (S₃).

El fraccionamiento subcelular de la corteza cerebral de ratón mostró la presencia de PhLP_L asociada fundamentalmente a las membranas plasmáticas sinápticas (*SPM*) y menos en los compartimentos solubles (Figura 28).



3.3.1.2.- Caracterización por peso molecular.

Se generó un anticuerpo policlonal, según el procedimiento descrito en Materiales, frente a una secuencia del extremo N-terminal de la PhLP_L que se sabe está presente en la fosducina (Phd) y es la responsable de la unión al dímero $\beta\gamma$ de la proteína G.

Se trabajó con membranas P₂ de cerebro de ratón y de corteza cerebral de rata y ratón, obteniéndose la fracción de membrana (P₂) por homogeneización y centrifugación en tampón TEL (Tris-ClH 25 mM, pH 7.5, EGTA 1 mM, leupeptina 10 μ M), con sacarosa 0.32 M. La resuspensión final se realizó en tampón TEL, a una concentración de proteína en torno a 5 μ g/ μ l y se conservaron a -70°C hasta el momento de ser utilizadas.

La afinidad y especificidad de los sueros se determinó por inmunodetección (*Western blotting*), sobre las muestras anteriores sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida/dodecilsulfato sódico (SDS/PAGE) y posteriormente transferidas a membranas capaces de retener las proteínas, verificando que reconocen la Phd y PhLP_L recombinantes de varias fuentes.

Los sueros inmunorreaccionaron con proteínas de peso molecular de 45 kDa, en las preparaciones de rata y ratón, y es similar al descrito para PhLP_L de rata (*Schröder y Lohse, 2000*) (Figura 29, calles 1-3).

Figura 28. Localización subcelular de la PhLP_L en la corteza cerebral de ratón. Inmunodetección, con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L, de las diferentes fracciones obtenidas por centrifugación a distintas velocidades de un homogeneizado procedente de la corteza cerebral de varios ratones: P2: sedimento rico en sinaptosomas y microsomas, S2: sobrenadante 2 enriquecido en microsomas, SPM: sedimento procedente del lisado de la fracción P2 rico en membranas plasmáticas, P3: es el sedimento enriquecido en membranas microsomales, obtenido a partir del S2, S3: sobrenadante 3 obtenido tras el procesamiento del P3. Proteína total por calle: 50 µg.

Sin embargo, este peso molecular es superior al teórico estimado a partir de la secuencia aminoacídica de la PhPL_L (humana y de rata) que coincide con la banda de 35 kDa correspondiente a la PhLP_L recombinante obtenida a partir de su expresión en *E. coli*.

De las posibles modificaciones postraduccionales descritas para la PhLP_L: fosforilaciones por proteína quinasa dependiente de AMPc, proteína quinasa C, caseína quinasa II (Lee y col., 1990a, 1990b) y la quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina tipo II (Thulin y col., 2001), N-glicosilaciones (Lee y col., 1990a, 1990b) y miristoilaciones (Craft y col., 1998), únicamente los residuos glicosilados son capaces de alterar en este grado la movilidad electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida, por lo que un punto de interés es comprobar si esta proteína en estado nativo presenta modificaciones postraduccionales tipo N-glicosilación.

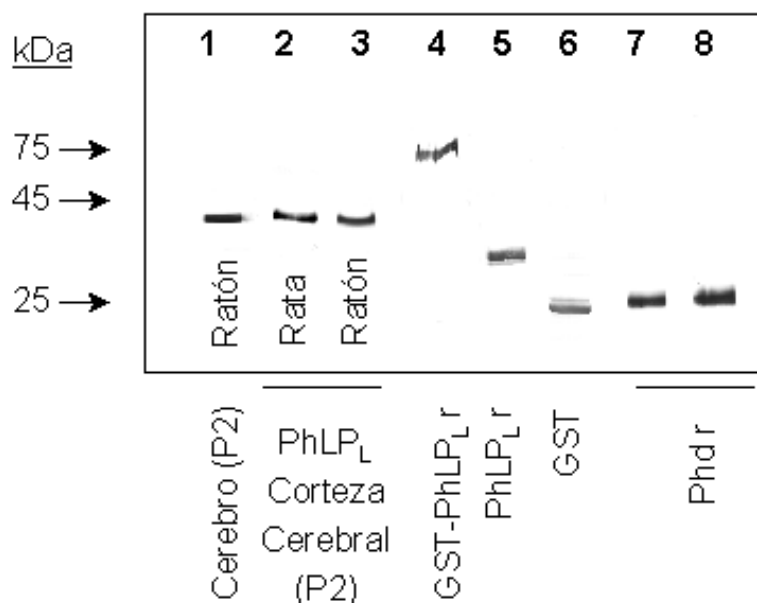


Figura 29. Inmunodetección con el anticuerpo anti-PhLP_L/Phd de membranas (P₂) de cerebro de ratón (calle 1), de corteza cerebral de rata (calle 2) y ratón (calle 3), y comparación con la PhLP_L recombinante de rata (calles 4 y 5), y la Phd recombinante de rata adquirida a Calbiochem (calle 7) y la cedida por el Dr. Schulz (calle 8). En la calle 4 se muestra la inmunodetección de la proteína de fusión GST-PhLP_L expresada en *E. Coli*, y en la calle 5 y 6 la inmunorreactividad después de su digestión con trombina, con el anticuerpo anti-PhLP_L/Phd y anti-GST, respectivamente.

Tras confirmar la eficacia del anticuerpo se estableció la selectividad del mismo observando la disminución significativa en los niveles de esta proteína en membranas P₂ de diferentes áreas del S.N.C. de ratones *knock-down* en los que se encuentra reducida la síntesis de la PhLP_L tras la administración del ODN-PhLP_L 200-215 dirigido a la secuencia de nucleótidos del 200 al 215 del ARNm que codifica dicha proteína. Las señales inmunorreactivas fueron cuantificadas por densitometría óptica, obteniéndose unos porcentajes de disminución de 43±4% en la corteza cerebral, 41±5% en SGPA y de 50±4% en el estriado, con respecto al grupo de animales control que recibieron el ODN-*mismatch* (ODN-PhLP_L-M). Las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$. En la figura 30 se presenta un experimento representativo en el que se observa la reducción de la señal inmunorreactiva.

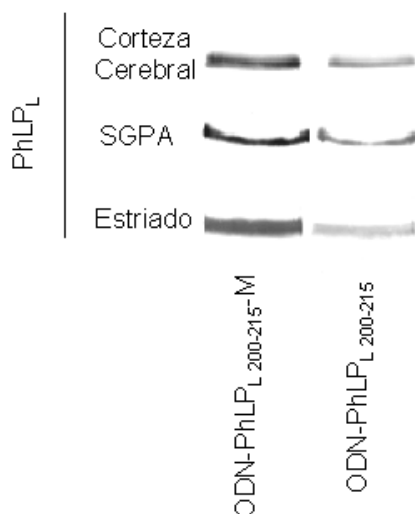


Figura 30. Inmunodetección con el anticuerpo anti-PhLP_L/Phd de membranas (P₂) procedentes de corteza cerebral, estriado y SGPA de animales tratados con el ODN-PhLP_L 200-215 y su correspondiente control (ODN-PhLP_L 200-215-*mismatch*). 50 µg de proteína de las distintas estructuras fueron solubilizadas con SDS y resueltas en geles de 10-20% acrilamida/2,6% bisacrilamida.

3.3.1.3.- Caracterización por punto isoelectrico.

Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa, que refleja la de los aminoácidos cargados que contienen. Al aplicar un campo eléctrico a una solución que contiene una molécula proteica, la proteína migra a una velocidad que depende de su carga neta, de su tamaño y de su forma. Para cada proteína existe un pH característico, denominado *punto isoelectrico*, al que la proteína no presenta carga neta y, por lo tanto, no migra en un campo eléctrico. Mediante isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida en el que se ha establecido un gradiente de pH cada proteína se desplaza hasta la zona de gradiente que presenta un pH igual a su punto isoelectrico, y allí permanece inmóvil.

El punto isoelectrico predicho para la PhLP_L según su composición aminoacídica con el programa *Protean (DNASTAR)* es de 4,6, y es consistente con el obtenido experimentalmente en nuestro laboratorio para la PhLP_L recombinante de rata y la PhLP_L purificada del cerebro de ratón (Figura 31) a partir de cromatografía de afinidad usando las

IgGs purificadas de los sueros previamente caracterizados, acopladas a una columna de CNBr-Sepharose[®] 4B (Amersham Pharmacia).

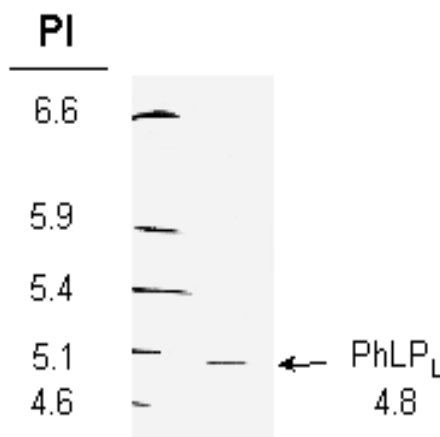


Figura 31. Isoelectroenfoque de la PhLP_L purificada del cerebro de ratón. Se empleó unos estándares que presentan puntos isoeléctricos comprendidos en el rango de 3,6 a 6,6 (Sigma). Los geles fueron teñidos con Coomassie.

3.3.1.4.- Caracterización de las modificaciones postraduccionales de la PhLP_L.

3.3.1.4.1.- Deglicosilación de la PhLP_L.

Las imágenes obtenidas en geles de poliacrilamida nos sugerían la existencia de residuos N-glicosilados, como ha sido descrito en el apartado anterior. Trabajos previos describen que el residuo de Asn152 (*Lee y col., 1990a, 1990 b*) de la Phd y la correspondiente Asn en el residuo 189 de la PhLP_L, son susceptibles de glicosilarse. La solubilización de membranas P₂ de corteza cerebral y médula de ratón con Triton X-100 y su paso por columnas de afinidad WGL facilitó el análisis del patrón de inmunorreactividad observado tras SDS/PAGE. Estos pasos previos a la electroforesis contribuyeron a un enriquecimiento de las muestras en proteínas glicosiladas. El anticuerpo anti- Phd/PhLP_L reconoció una banda en estas muestras de 45 kDa. El patrón de

inmunorreactividad detectado fue similar para las dos estructuras analizadas en cuanto a intensidad de las bandas observadas (Figura 32).

En membranas incubadas con endoglicosidasa F de *Flavobacterium meningosepticum*, se observó pérdida de inmunorreactividad asociada a pesos moleculares de 45 kDa, y la aparición de una banda de 35 kDa, que corresponde al peso molecular teórico de la proteína recombinante (Chen y col., 1993). Este resultado sugiere que el peso molecular superior al teórico corresponde a una forma N-glicosilada de la proteína.

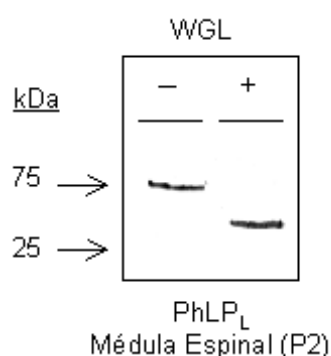


Figura 32. Deglicosilación de la PhLP_L. Inmunodetección, con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L, de membranas P₂ de médula de ratón sometidas a cromatografía en columna de WGL, controles (-) y sometidas a deglicosilación (+). Proteína total por calle: 350 µg.

3.3.1.4.2.- Fosforilación de la PhLP_L.

Se ha descrito un ciclo de regulación de la Phd en base a la fosforilación por proteína quinasa A (PKA) de la serina 73 y defosforilación por fosfatasas del tipo 1/2A, a favor de su unión y disociación de las subunidades Gβγ (Lee y col., 1990a; Miles y col., 1993; Craft y col., 1998). Hay un equivalente de esta serina en la PhLP_L en el residuo 110 que también es susceptible de fosforilarse por PKA. Esto sugiere una posible modulación de la actividad de la PhLP_L por este mecanismo que causa un cambio en la forma y función de la proteína.

Nos interesó caracterizar más profundamente esta posible regulación. Para esto, se analizó la fosforilación de la PhLP_L recombinante de rata, obtenida a partir de su expresión

en *E. coli*, y de la PhLP_L purificada a partir de cerebro de ratón, mediante unas columnas de afinidad construidas con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L. Nuestro resultado confirma que esta proteína es sustrato de fosforilación por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKAc) (Figura 33). Aunque se ha descrito que su cinética de fosforilación es más lenta que la de la Phd (Thulin y col., 1999), este dato es consistente con un posible papel regulador de esta quinasa sobre la PhLP_L (Bauer y col., 1992).

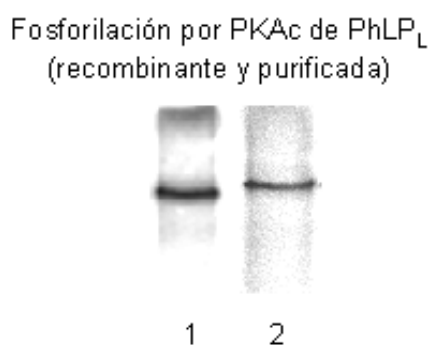


Figura 33. Autorradiografía de la fosforilación por PKA de la PhLP_L. En la calle 1 se presenta la fosforilación de la PhLP_L recombinante de rata, y en la calle 2 de la purificada del cerebro de ratón. Cada una de las bandas corresponden a 1μg de la proteína fosforilada por la PKAc (*protein kinase A catalitic*) bovina.

3.3.2.2- Distribución y cuantificación de la PhLP_L en el S.N.C. de ratón.

Tras confirmar que es en la zona de la membrana plasmática donde se concentra la mayor parte de la PhLP_L, procedimos a su análisis, para establecer su presencia y distribución en las distintas áreas del S.N.C. de ratón. Los animales fueron sacrificados por decapitación y se diseccionaron las distintas estructuras a mano sobre hielo: corteza cerebral, estriado, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, SGPA, bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal. Cada una de las estructuras procedentes de un grupo de 5 ratones se procesó para obtener la fracción rica en sinaptosomas (P₂) que se resuspendió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, a una concentración de proteína en torno a 3-5 μg/μl y se guardó a -70°C hasta el momento en que fueron empleadas.

Resultados

Las membranas P₂ de la corteza cerebral de ratón fueron solubilizadas con SDS antes de ser sometidas a electroforesis. Se descongeló la proteína y se resuspendió a una concentración de 2-4 µg/µl en tampón de solubilización de muestras para SDS/PAGE, calentándose a 100°C 5 min. Las muestras así solubilizadas se cargaron en los geles (1, 3, 10 y 30 µg de proteína/calle); igualmente, en algunas calles se cargaron cantidades crecientes de la PhLP_L recombinante de rata comprendidas en el rango de 0,20 a 2,0 pmol.

Tras el análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas, una relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal fue observada con las IgG purificadas del suero anti-Phd/PhLP_L y las distintas cantidades de PhLP_L recombinante y de las preparaciones P₂ de la corteza cerebral de ratón. Pudiendo establecer una curva de calibrado que nos permitió calcular el nivel de esta proteína en la corteza cerebral de ratón (50 pmol/mg proteína P₂) (Figura 34). Los niveles del resto de las estructuras fueron igualmente calculados por densitometría óptica (Figura 35).

La PhLP_L se localiza en niveles prácticamente homogéneos de 50-60 pmol/mg de proteína P₂. Los valores descritos de la PhLP_L en la fracción citosólica de células neurales (*Schröder y Lohse, 2000*) es de aproximadamente 20 veces menor que en las membranas sinápticas (analizado en este trabajo).

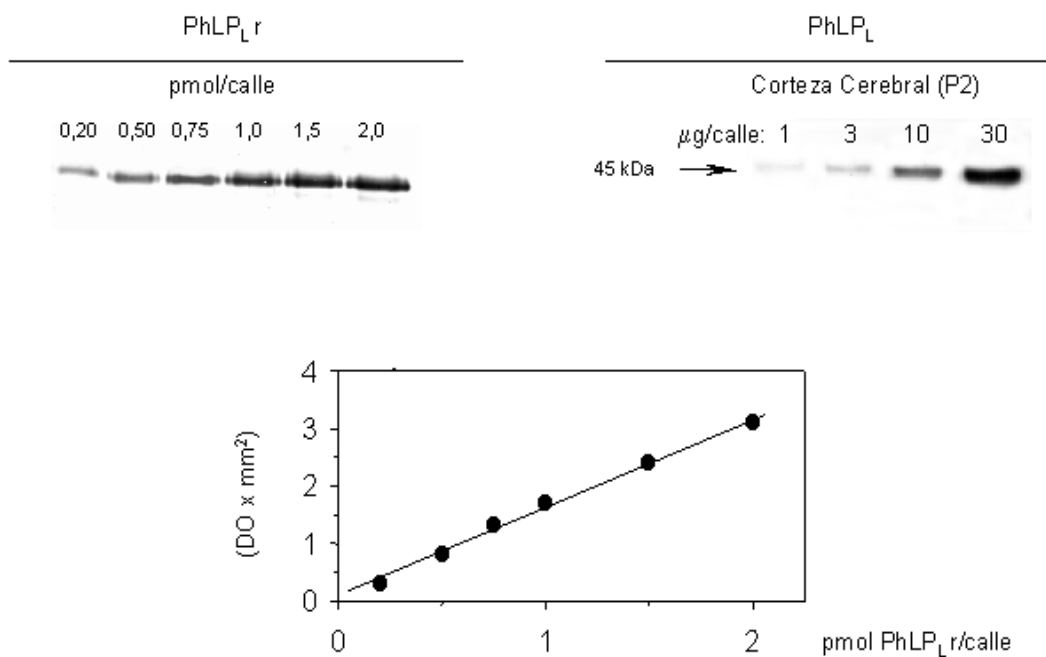


Figura 34. La relación lineal entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal obtenida (densidad óptica x mm²) es mostrada en la gráfica. La curva fue construida con cantidades crecientes de la PhLP_L recombinante expresada en *E. coli*, reconocida por el anticuerpo anti-PhLP_L/Phd. La cantidad de PhLP_L en la fracción de membrana (P₂) de la corteza cerebral de ratón, se calculó, extrapolando las DO (densidad óptica) x mm² correspondientes a las inmunoseñales obtenidas por *Western-Blot* de cantidades crecientes de P₂.

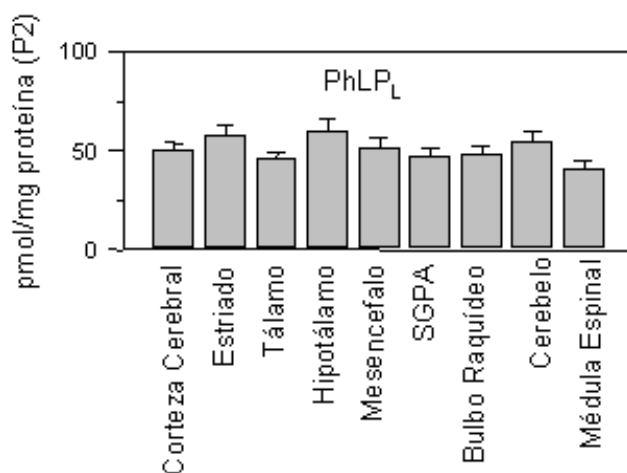


Figura 35. Distribución y cuantificación de la PhLP_L en la fracción de membrana (P₂) de las distintas áreas del S.N.C. de ratón. Las muestras fueron resueltas por SDS/PAGE y la inmunorreactividad cuantificada en base a la curva de la PhLP_L recombinante, por densitometría óptica.

3.3.3.- Estudio de los mecanismos de regulación de la función de la PhLP_L.

Con el fin de identificar los principales mecanismos y señales que regulan la actividad de esta proteína, el estudio se abordó a varios niveles, que incluyen la fosforilación de la PhLP_L por proteína quinasa A (apartado 3.3.1.4.2 de esta sección) y la interacción de PhLP_L con la proteína de anclaje 14-3-3, que se une a proteínas con residuos de Ser o Thr fosforilados, y esta implicada en la activación de proteínas quinasas, control del ciclo celular, y regulación de la apoptosis (*Torzón y col., 1998; Tzivion y col., 1998; Brunet y col., 1999*).

Se ha descrito que su fosforilación por PKA y, sobre todo, por CaMKII, regula la interacción de la Phd con G_tβγ, al promover su disociación. La Phd fosforilada inicia una interacción con la proteína adaptadora 14-3-3, a la espera de ser defosforilada, y

Resultados

permite así su unión al dímero $G_i\beta\gamma$ (McLaughlin y col., 2000; Nakano y col., 2000; Thulin y col., 2001). Por homología, ampliamos esta idea de regulación de la función a la PhLP_L y tras comprobar que tanto la proteína 14-3-3 como la PhLP_L están presentes en el astrocito de rata, analizamos su posible interacción *in vivo* por inmunoprecipitación.

Sabiendo que en la retina, la Phd está defosforilada o fosforilada en virtud a la exposición a la luz (Lee y col., 1987), los astrocitos fueron tratados con DPDPE 1 μ M, un agonista del receptor opioide δ , durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, fueron solubilizados con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 1%, PMSF 0,1 mM, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasa y fosfatasas (Sigma), para evitar su degradación y posible defosforilación. La incubación de este extracto con 2,5 μ g/mL de anticuerpo anti-Phd/PhLP_L y proteína-A agarosa, permitió la captura de los inmunocomplejos formados que fueron solubilizados con SDS para su análisis por *Western-blotting*, con los anticuerpos anti- $G\beta_{1/2}$ y anti-14-3-3.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas reveló que la señal inmunorreactiva del complejo PhLP_L/ $G\beta_{1/2}$ es significativamente mayor, a la obtenida para PhLP_L/14-3-3, cuando los astrocitos fueron tratados con DPDPE (Figura 36), y son similares a los obtenidos en extractos retinales sometidos a la luz (Nakano y col., 2001).

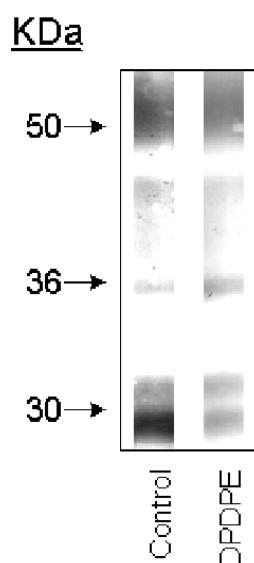


Figura 36. Inmunoprecipitación de PhLP_L/Gβ_{1/2} y PhLP_L/14-3-3 en astrocitos control y astrocitos sometidos, durante 30 minutos, a tratamiento con el agonista del receptor opioide δ DPDPE 1μM. Los inmunocomplejos fueron precipitados con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L y proteína-A agarosa, y fueron revelados con el anticuerpo frente a la 14-3-3 (banda inmunorreactiva correspondiente a los 28 kDa) y anti-Gβ_{1/2} (36 kDa). La banda que se observa en los 50 kDa corresponde a la cadena pesada de la IgG.

3.3.4- Estudios comportamentales.

Una vez comprobada la presencia y distribución de la PhLP_L en el sistema nervioso central de ratón que anticipa un posible papel regulador de la señalización mediada por proteínas G, procedimos a estudiar su influencia en la respuesta funcional (analgesia supraespinal) inducida por agonistas opioides y no opioides en fenómenos de tolerancia aguda y crónica.

3.3.4.1.- Implicación de la PhLP_L en la analgesia inducida por agonistas opioides y no opioides.

En una primera fase de los estudios de analgesia se analizó la participación de la PhLP_L en la respuesta antinociceptiva producida por agonistas opioides y un agonista α₂-adrenérgico, tras reducir su síntesis con un tratamiento subcrónico de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) dirigidos a una secuencia específica de nucleótidos del ARNm de la proteína PhLP_L.

La respuesta de los animales al estímulo nociceptivo térmico se determinó tras la administración en el ventrículo lateral (i.c.v.) de 0,070 pmol de DAMGO, 0,3 nmol de β-endorfina-(1-31), 10 nmol de morfina, DPDPE y [D-Ala²]deltorfina II y 150 nmol de clonidina, por animal. Todas las inyecciones se hicieron en un volumen final de 4μl/ratón. El tratamiento con ODNs no alteró la latencia basal de los animales cuyo valor está comprendido en un rango de 1,6±0,1 segundos (media ± E.S.M).

La analgesia inducida por los distintos compuestos se valoró a los 15 min de la administración de DAMGO y DPDPE, a los 10min de la administración de [D-Ala²]deltorfina II, y a los 30min de la administración de morfina, β -endorfina-(1-31) y clonidina. Las dosis de los agonistas y los intervalos de medida fueron elegidos en base a estudios previos, y corresponden a dosis de los agonistas que inducen un incremento en el tiempo de reacción sobre la basal, del orden del 50-80% en el pico de máximo efecto analgésico. En concreto, para DAMGO, [D-Ala²]deltorfina II, DPDPE y clonidina fueron $44\pm 3\%$, $48\pm 3\%$, $50\pm 4\%$ y $38\pm 3\%$, respectivamente; la eficacia analgésica producida por la administración de β -endorfina-(1-31) y morfina fue superior, con un valor de $66\pm 4\%$ y $80\pm 5\%$ del MEP (Figura 37A).

La disminución experimental de la PhLP_L con ODNs dirigidos a secuencias de la PhLP_L (ODN-PhLP_L 175-190 y ODN-PhLP_L 278-292) conduce a pérdidas significativas de potencia analgésica opiácea a diferentes intervalos posteriores a la administración de 10nmol de morfina y también a un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-efecto de morfina medida a los 30 min de su administración (Figura 37B). La disminución de la actividad analgésica a las dosis descritas anteriormente, también fue observada para el resto de los agonistas opioides y no opioides empleados en el estudio (Figura 37C).

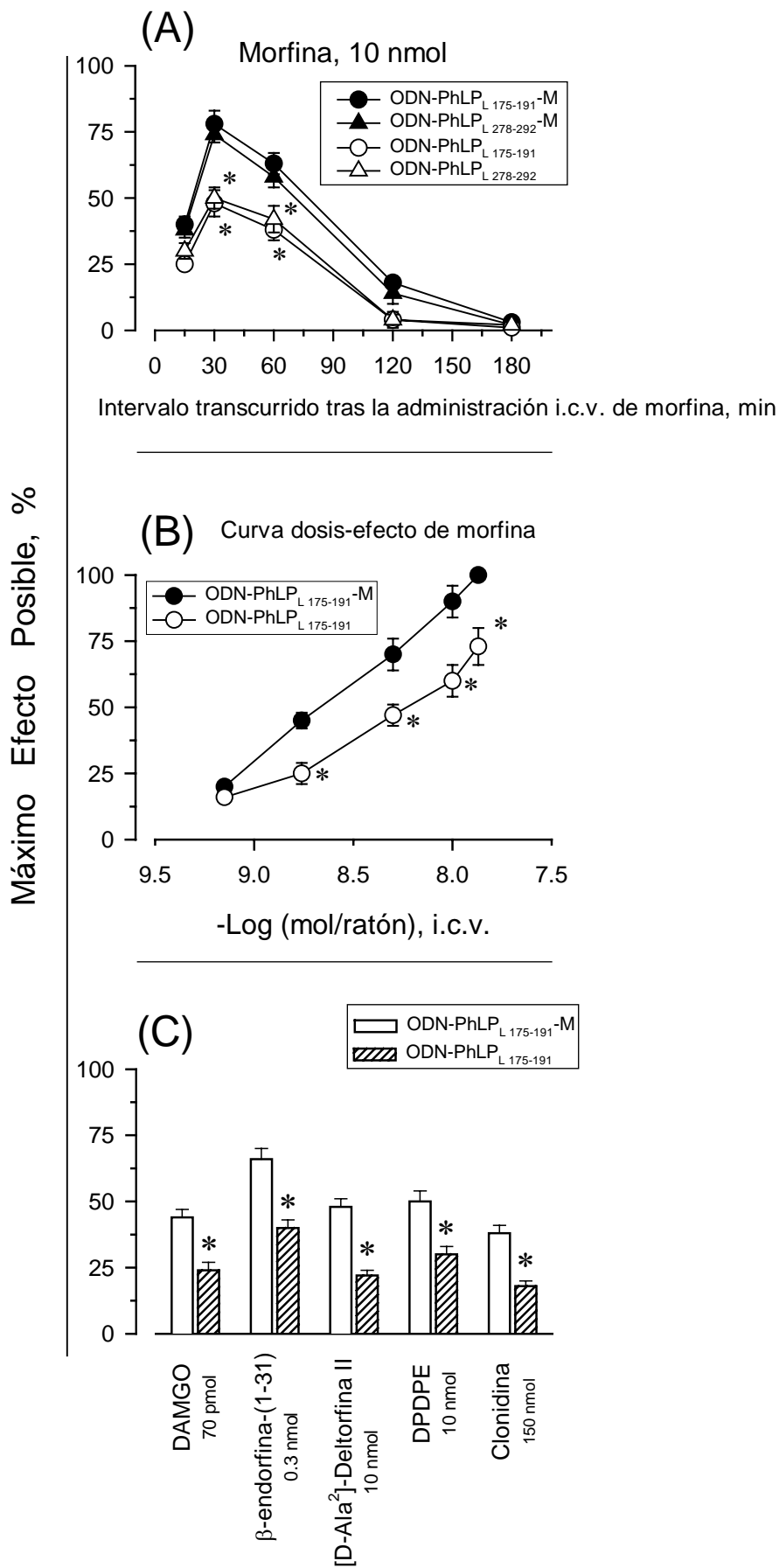


Figura 37. Efecto analgésico en ratones *knock-down* de PhLP_L. (A) Influencia de la PhLP_L sobre la analgesia inducida por morfina. Distintos grupos de animales pretratados con los ODN-PhLP_L: ODN-PhLP_{L 175-190}, ODN-PhLP_{L 278-292}, y sus correspondientes controles (*mismatch*), fueron inyectados i.c.v. con una dosis de morfina de 10 nmol y la analgesia fue medida con el test de *tail-flick* a varios intervalos. (B) Curvas dosis efecto de la analgesia evocada por el agonista opioide morfina en animales control pretratados con el ODN-*mismatch* o con el ODN-PhLP_{L 175-191}. Los animales recibieron el agonista vía i.c.v., midiéndose la respuesta analgésica a los 30 min. (C) Efecto de la disminución experimental de PhLP_L con el ODN-PhLP_{L 175-191} sobre la potencia antinociceptiva de un agonistas μ (DAMGO), δ (DPDPE y [D-Ala²]deltorfina II), o agonista μ/δ β -endorfina-(1-31), y α_2 -adrenérgico (clonidina). Los valores son la media \pm E.S.M. (n=20). * Diferencias significativas respecto al grupo control que recibió el ODN-*mismatch*. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación empleado fue $P < 0,05$.

3.3.4.2.- Efecto de la PhLP_L en la tolerancia aguda inducida por morfina.

Los datos anteriores nos llevaron a investigar la implicación de la PhLP_L en situaciones en las que la acción de una dosis analgésica de un opioide acarrea pérdidas en la potencia de dosis sucesivas (taquifilaxia) o cuando se administran en el intervalo de varias horas (tolerancia aguda).

La influencia de PhLP_L en la tolerancia aguda a morfina a lo largo del tiempo fue analizada en animales tratados con el ODN-PhLP_{L 175-191}. Los ratones que fueron inyectados durante 5 días consecutivos con dosis crecientes del ODN-PhLP_{L 175-191} o ODN-*mismatch*, recibieron al 6° día una DE₈₀ de morfina capaz de producir taquifilaxia, y se distribuyeron en varios grupos, cada uno de los cuales recibió una segunda dosis de morfina (también de 10nmol), a distintos intervalos después de la primera dosis (desde el 2° hasta el 9° día), evaluándose la analgesia 30min después con el test de *tail-flick*.

En el grupo de animales control (que recibieron el ODN-*mismatch*) la potencia de la primera dosis se recuperó al 6° día después de su administración. Sin embargo, la

recuperación del nivel de analgesia en los animales *knock-down* requirió un intervalo mayor como se representa en la figura 38.

El efecto del ODN-PhLP_L 175-191 sobre los niveles de la proteína y la disminución de la actividad analgésica de la morfina desaparecen a los 3 días de finalizar el tratamiento con el ODN. Esto fue determinado por el análisis de la recuperación de la respuesta analgésica, en grupos de ratones distintos, que recibieron una dosis de 10nmol de morfina tras el tratamiento con el ODN. Los datos así obtenidos se muestran en la figura 5 como una línea discontinua. Así, la disminución de la potencia antinociceptiva de la morfina por el ODN es aumentada por inyección del opioide durante los intervalos en los que la proteína es reducida. Teniendo en cuenta en los animales *knock-down* de PhLP_L que la recuperación de los efectos de la morfina no es similar a lo observado en el grupo control, podemos establecer que la administración de la primera dosis de morfina a ratones en los que está disminuida la expresión de la PhLP_L promueve una tolerancia aguda al opioide duradera más de los 9 días analizados en este estudio (Figura 38).

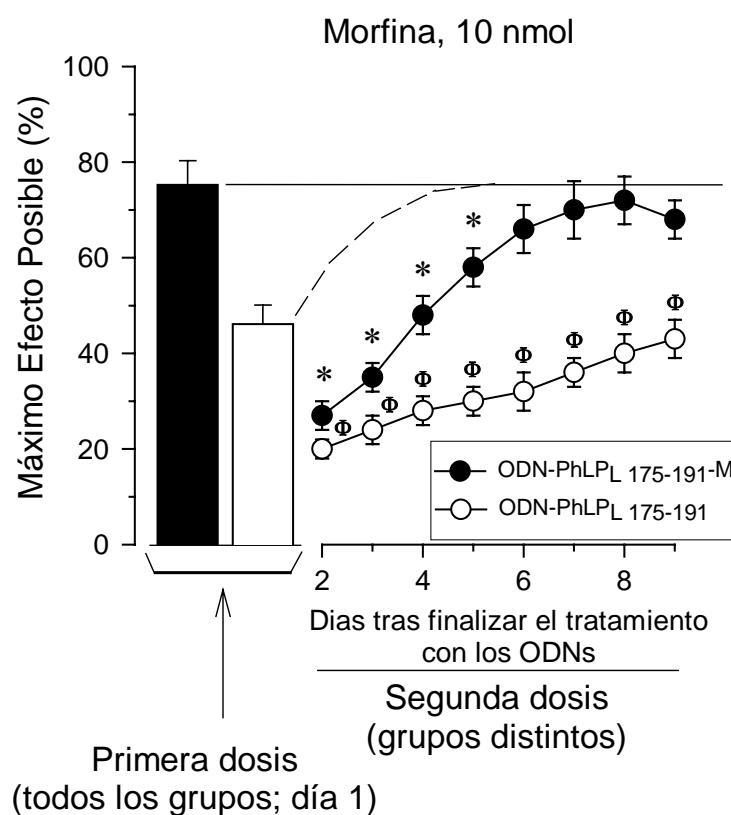


Figura 38. Efecto de la administración subcrónica del ODN-PhLP_{L 175-191} sobre la analgesia suraespinal inducida por morfina en ratones sometidos a tratamiento agudo con el opioide. Una primera dosis de 10 nmol de morfina, capaz de producir tolerancia aguda, fue administrada a distintos grupos de ratones los cuales recibieron el ODN-PhLP_{L 175-191} o el ODN-*mismatch*, y se midió su efecto analgésico (representándose en la figura con barras). En paralelo, y en grupos distintos se evaluó la analgesia inducida por la administración de una 2^a dosis de morfina 30 min después de su inyección, a diferentes intervalos espaciados 24 h. Los valores son la media ± E.S.M. de grupos de 10-15 ratones. * Diferencias significativas respecto a la potencia analgésica de la primera dosis en ratones control. Φ Diferencias significativas respecto al efecto de la primera dosis de morfina en ratones que han recibido el ODN-PhLP_{L 175-191}. La línea discontinua nos muestra la recuperación total de la respuesta analgésica, al 3^{er} ó 4^o día después de finalizar el tratamiento con el ODN-PhLP_{L 175-191}. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, P<0,05.

3.3.4.3.- Efecto de la administración in vivo de subunidades G α_{i2} -miristoiladas en la tolerancia aguda evocada por morfina.

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que la administración *in vivo* de proteínas G miristoiladas son capaces de incorporarse funcionalmente a la regulación de receptores y demuestran que es posible restablecer la funcionalidad del sistema cuando se ha producido un empobrecimiento localizado del número y/o estado funcional de las proteínas G (Garzón y col., 1999). En ausencia de deterioro de la transducción las G α exógenas no amplifican las señales originadas por agonistas, tampoco las pérdidas de efecto por reducción experimental en el número de receptores. Sin embargo, en situaciones en las que la acción de una dosis analgésica de un opiáceo, por ejemplo, morfina, acarrea pérdidas en la potencia de dosis sucesivas (taquifilaxia) o cuando se administran en el intervalo de varias horas (tolerancia aguda), las G α exógenas son capaces de prevenir e incluso revertir la aparición de taquifilaxia (Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001).

Por tanto, la administración de las subunidades G miristoiladas constituyen una herramienta que permite esclarecer si la falta de funcionalidad del sistema reside a nivel del receptor o la transducción. Basándonos en ello y en los resultados previos en los que se demuestra que la disminución experimental de la PhLP que se une a G $\beta\gamma$ libres,

atenúa la función de los receptores opioides, investigamos el posible efecto de la administración de $G\alpha_{i2}$ -exógenas en animales *knock-down* que presentan tolerancia aguda a morfina (Figura 39).

En estas circunstancias 12 pmol de $G\alpha$ exógenas administradas 2 horas antes de la segunda dosis de morfina (Garzón y col., 1999; Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001), no restauran los efectos opioides, lo que indica que los receptores en ausencia de PhLP_L son diana de las GRK y pasan a ser desacoplados de la transducción.

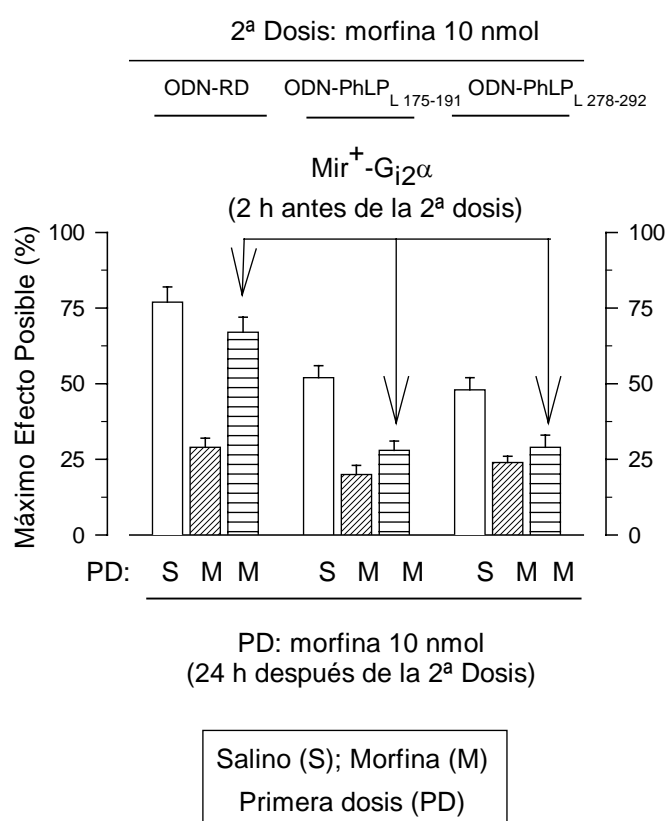


Figura 39. Efectos de la administración de subunidades $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas en animales pretratados con ODN-PhLP_L sobre la tolerancia aguda a morfina. Tras el deterioro provocado por la administración de ODNs a nivel de la PhLP_L, detectamos que las $G\alpha$ -exógenas no son capaces de recuperar el efecto analgésico de una 2^a dosis de morfina en animales que han recibido, 24 h antes, una 1^a dosis del agonista de 10 nmol que se sabe induce tolerancia aguda en el ratón.* Diferencias significativas respecto al grupo control que recibió el ODN-RD. Como en los casos anteriores, las diferencias significativas se determinaron por análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación fue $P < 0,05$.

En otro sentido, se ha descrito que tras la activación por un agonista de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR-*G protein coupled receptor*), la Phd (que es una proteína citosólica) se disocia del dímero $G\beta\gamma$, el cuál se localiza en la membrana plasmática a través de un prenilo ubicado en el terminal carboxílico de la subunidad $G\gamma$ (Simonds y col., 1991). Estos dímeros $G\beta\gamma$ también son el anclaje de las GRK (Inglese y col., 1992) a la membrana que le permite fosforilar los GPCR. La Phd en estado defosforilado se liga con alta afinidad a las subunidades $G\beta\gamma$ (Blüml y col., 1997), y compite por su unión con otras proteínas como las GRKs y efectores (Hekman y col., 1994; Pitcher y col., 1992).

Así, por homología con la Phd, comprobamos por inmunodetección si se produce una traslocación de la PhLP_L y $G\beta_{1/2}$, de la membrana plasmática al citosol, tras la activación del receptor por la dosis de morfina empleada en los estudios anteriores y que es capaz de producir tolerancia aguda (DE₈₀),

Para este estudio se eligió el tálamo, por ser una estructura con abundantes receptores opioides μ , y se obtuvieron por centrifugación las fracciones ricas en sinaptosomas y la fracción citosólica, que fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en un gradiente de 10-20% de acrilamida/2,6% bisacrilamida, y transferidas a membranas de PVDF de 0,2 μ m. Posteriormente, se realizó el ensayo de inmunodetección con los anticuerpos policlonales frente a cada una de las proteínas, observándose bandas inmunorreactivas de 47 kDa, que corresponde al peso molecular de la PhLP_L glicosilada y de 36 kDa para las subunidades $G\beta_{1/2}$ (Figura 40). La administración de la DE₈₀ de morfina no alteró el patrón de distribución de estas proteínas en los compartimentos analizados, que se muestra similar en ambos grupos (PhLP_L y $G\beta_{1/2}$ están mayoritariamente asociadas a membrana).

Asimismo, en este estudio se confirmó de nuevo la especificidad del ODN para reducir la expresión de la PhLP_L, sin afectar a la síntesis de otras proteínas, como por ejemplo las subunidades $G\beta_{1/2}$.

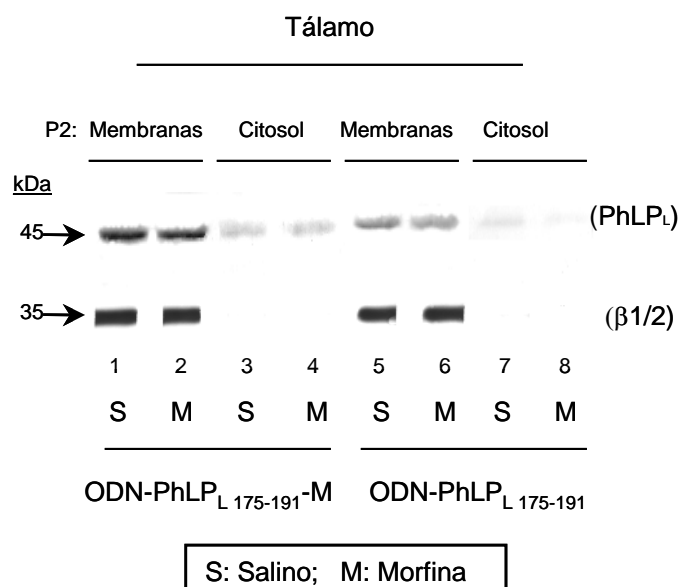


Figura 40. *Western-Blotting* de solubilizados de fracciones P₂ y citosol de tálamo procedente de 5-8 ratones tratados con el ODN-PhLP_{L 278-292}, o su correspondiente control (*mismatch*), han demostrado que las proteínas asociadas a membrana: PhLP_L y la $\beta_{1/2}$, no sufren translocación al citosol tras la activación del receptor por un agonista. Tras el tratamiento subcrónico con el ODN los animales recibieron una inyección i.c.v. de salino (S) o 10 nmol de morfina (M), y a los 30 min se sacrificaron por decapitación para obtener las fracciones de membrana y citosol.

3.3.4.4.- Efecto de la PhLP_L en la tolerancia crónica a morfina.

Sabemos que el tratamiento crónico con opioides promueve el desacoplamiento funcional del receptor de las proteínas G, y en estadios posteriores, la inactivación permanente del receptor por la fosforilación de sus dominios intracelulares por GRKs. Para investigar el papel de la PhLP_L en los efectos crónicos de los opioides, se redujo su expresión con ODNs. Como modelo de administración crónica utilizamos animales implantados con una suspensión oleosa de morfina, previamente caracterizados como se describe en el apartado 1 de Resultados. La eficacia analgésica de una dosis i.c.v. de morfina de 10 nmol, que induce un efecto analgésico sobre el 80% del máximo posible en el test de *tail-flick*, fue evaluada en estos animales, a diferentes intervalos (Figura 41).

En paralelo, llevamos dos grupos de animales, un control que recibieron el ODN-*mismatch*, para evaluar el posible efecto tóxico de la administración de nucleótidos sulfotionados en el vehículo, y otro grupo inyectado con el ODN-PhLP_L 175-191. La interferencia causada por la tolerancia aguda a la DE₈₀ de morfina se previno utilizando un grupo diferente de ratones en cada evaluación del efecto opioide. Así, cada animal recibió una sola inyección de morfina.

Los datos obtenidos muestran como en ambos grupos de animales se produce una bajada significativa del efecto analgésico inducido por el agonista, durante los tres días siguientes a la implantación de la suspensión oleosa. En el grupo control la potencia analgésica de la DE₈₀ de morfina, se recupera a los 10 días de iniciar el tratamiento crónico con el opioide. Sin embargo, en los ratones *knock-down* se requiere un intervalo de tiempo más prolongado para la recuperación de la respuesta producida por esta dosis de morfina fijada en el estudio (Figura 41A).

De forma similar a los experimentos de inmunodetección realizados en el apartado anterior, comprobamos que no hubo cambios en los niveles de expresión de la PhLP_L en membranas P₂ durante el desarrollo de tolerancia/dependencia y en intervalos posteriores en los que se observa una recuperación de la respuesta analgésica del opioide. (Figura 41B).

3.3.4.5.- Efecto del ODN-PhLP_L administrado in vivo, sobre la unión específica de la [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β_h-endorfina-(1-31) a membranas P₂ de SGPA de ratones knock-down.

Los resultados hasta ahora expuestos ponen de manifiesto que una disminución en los niveles de la PhLP_L claramente atenúa la función de los receptores opioides, al tiempo que se sugiere que tras reducirse el papel protector que ejerce la PhLP_L sobre los receptores acoplados a proteínas G, las GRKs ganan fácil acceso a los dímeros Gβγ procediendo así a fosforilar residuos de estos receptores y provocando su desensibilización.

Por tanto, los mecanismos responsables de la taquifilaxia o tolerancia aguda se localizan a nivel de la membrana celular en las proteínas G y su regulación. Así, mediante estudios de unión de un ligando radiactivo, que nos permite medir el número o densidad de sus sitios de unión, pudimos comprobar que el efecto que sobre los opioides tiene la disminución de PhLP_L no se debe a la fosforilación y posterior internalización del receptor μ . Para ello, se realizaron ensayos de saturación con la [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) en membranas P₂ de cerebro de ratón procedente de ratones *knock-down* de PhLP_L.

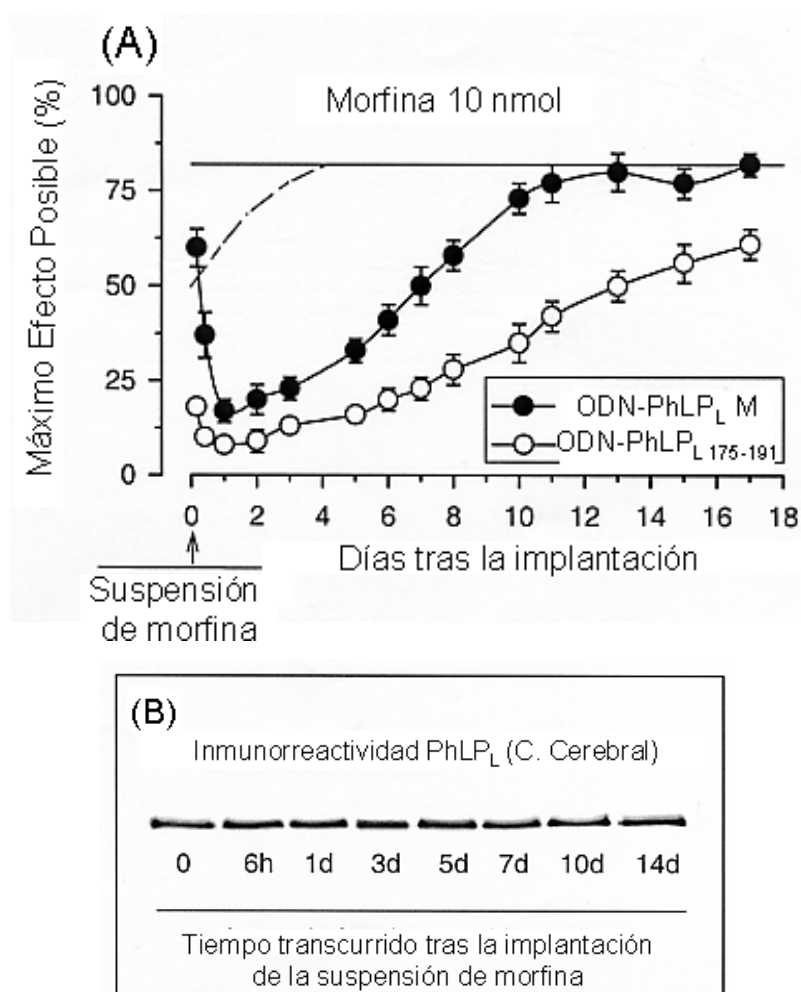


Figura 41. (A) Efecto de la administración subcrónica del ODN-PhLP_L 175-191 sobre la analgesia suraespinal inducida por morfina en ratones sometidos a tratamiento crónico con el opioide. Se llevaron dos grupos en paralelo, uno que recibió el ODN-PhLP_L 175-191 y su correspondiente control tratado con el ODN-*mismatch*. Al finalizar el tratamiento con el ODN, los ratones se distribuyeron en varios grupos y fueron implantados (a tiempo 0) con

una suspensión oleosa de morfina. Posteriormente, y a distintos intervalos, cada grupo recibió vía i.c.v. una dosis de 10 nmol de morfina que induce un efecto analgésico del 80% sobre el MEP en ratones tratados únicamente con esta dosis del opioide (representado en la gráfica con una línea continua), midiéndose la respuesta antinociceptiva a los 30 min de su administración. La línea discontinua indica la recuperación de la potencia analgésica de la morfina, en otro grupo de animales, tras el tratamiento con el ODN-PhLP_{L 175-191}. Los valores son la media \pm E.S.M. de cada grupo. * Diferencias significativas con respecto a los controles. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

(B) Inmunodetección, con el anticuerpo anti-PhLP_L, de membranas P₂ de corteza cerebral de ratones (30 μ g/calle), a distintos intervalos después de iniciar el tratamiento crónico con morfina. La banda inmunodetectada es de un peso de 47 kDa y corresponde con la PhLP_L glicosilada.

La estructura seleccionada para este estudio fue la SGPA, por ser a este nivel donde se localiza la gran mayoría de los receptores opioides que median la analgesia supraespinal de sustancias inyectadas intracerebroventricular (i.c.v.). Tras su homogeneización con un medio isotónico tamponado (Tris-HCl 50mM, 0,32 M sacarosa, pH 7,5) y centrifugación, obtuvimos el sedimento de membranas (P₂), que se sometió a sucesivos lavados, consistentes en la resuspensión en el tampón adecuado y en una nueva centrifugación. El sedimento final se resuspendió en el tampón de incubación (Tris-HCl 50mM pH 7,5, con una mezcla de inhibidores de proteasas) a una dilución de membranas del rango de linealidad de la unión.

La β -endorfina-(1-31) es un neuropéptido que se une de manera específica a los receptores opioides μ/δ . Las condiciones idóneas del ensayo de unión de la [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) se determinaron en estudios previos y para bloquear de manera selectiva su unión a sitios δ sin interferir en su ocupación de sitios μ , los ensayos fueron llevados a cabo en presencia de 300 nM de ICI-174,864 (Garzón y col., 1995; 1998).

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa LIGAND (Munson y Rodbard, 1980) e indican que la [¹²⁵I]-Tyr²⁷ β _h-endorfina-(1-31) se unió a membranas de SGPA de ratón según un perfil analizable por la transformación de Scatchard, mostrando

un valor de K_d aparente de 0,3 nM que refleja la afinidad del ligando iodado por el receptor μ y una capacidad de unión de aproximadamente 50 a 60 fmol/mg de la proteína de membrana. La afinidad del neuropéptido por los receptores opioides μ así como la capacidad de unión no cambió tras el tratamiento con los ODNs dirigido a reducir la síntesis de la PhLP_L: ODN-PhLP_{L175-191} y ODN-PhLP_{L 278-292} o con sus correspondientes controles (*mismatch*), lo que indica que no hay cambio en el número de receptores opioides μ tras el tratamiento con el ODN selectivo de la PhLP_L. Y confirman que en el fenómeno de tolerancia la pérdida de señalización de receptores G (en este caso particular los opioides) no sólo depende de mecanismos que actúan a nivel de receptor (su fosforilación mediante quinasas específicas y posterior internalización por unión de β -arrestinas), sino que también implican mecanismos post-receptor en el entorno de las proteínas transductoras G, y de proteínas que modulan su función, como la PhLP_L, que condiciona la capacidad de las subunidades $\beta\gamma$ para unirse a las subunidades $G\alpha$, o a las RGS que regulan la función de la subunidad $G\alpha$ por activación de su actividad GTPasa intrínseca.

4.- Estudio de la internalización e incorporación funcional a la regulación de receptores de proteínas $G\alpha_{i2}$ -miristoiladas-exógenas.

Nuestro laboratorio han demostrado la captación por células neurales de subunidades $G\alpha$ recombinantes inyectadas en el líquido cefalorraquídeo de roedores, incorporándose funcionalmente a la regulación de receptores (*Garzón y col., 1999*).

Además, en situaciones en las que la acción de una dosis analgésica de un opioide acarrea pérdidas en su potencia, en función del tiempo de exposición al efecto agonista (taquifilaxia), o cuando la pérdida de potencia se manifiesta al efecto de dosis sucesivas, en el intervalo de varias horas (tolerancia aguda), las $G\alpha$ exógenas son capaces de prevenir e incluso revertir la aparición de taquifilaxia (*Garzón y Sánchez-Blázquez 2001*). Sin embargo, las pérdidas de efectos agonistas por reducción experimental del número de receptores no se suplen por estas $G\alpha$ exógenas.

Estos hallazgos indican que es posible restablecer la funcionalidad del sistema cuando se ha producido un empobrecimiento localizado del número y/o estado funcional de las proteínas G, al mismo tiempo que proporcionan una nueva herramienta, G α exógenas, para el estudio de los procesos producidos por la exposición aguda y crónica a los opioides.

Debido a la relevancia de este descubrimiento hemos analizado la funcionalidad de las G α administradas *in vivo*, así como el mecanismo y/o el lugar preciso de la superficie de la membrana celular, implicados en el reconocimiento e internalización de las proteínas G α tras ser administradas *in vivo*.

4.1.- Efecto de subunidades G α_{i2} -miristoiladas-exógenas sobre la actividad GTPásica estimulada por el receptor.

La unión de un agonista a un receptor acoplado a proteína G (GPCR) promueve la formación de complejos agonista-receptor-proteína G, que conducen a la activación de la proteína G. La proteína en estado inactivo es un heterotrímero de composición $\alpha\beta\gamma$ que contiene GDP unido a su subunidad α . Tras la unión de un agonista, la subunidad α se desprende del GDP y une GTP, y a continuación, la proteína se disocia en la subunidad G α -GTP más el complejo G $\beta\gamma$, cada uno de los cuales es capaz de regular de forma independiente la actividad de distintos efectores (Gilman, 1987; Birnbauner, 1990; Hille, 1992). La señalización termina cuando la subunidad G α , que posee actividad GTPásica, hidroliza el GTP a GDP liberando fosfato inorgánico (Pi), que la devuelve al estado de unión con G $\beta\gamma$ y acoplamiento a receptores.

Así, es posible medir la estimulación de la hidrólisis de GTP mediada por el receptor, ya que, cuando un agonista se une a un receptor se estimula el intercambio de GDP por GTP. En este sentido, está establecido que los opioides estimulan la GTPasa de alta afinidad (o baja Km) en diferentes áreas del cerebro de rata y ratón y que varios tipos/subtipos de subunidades G α contribuyen a la actividad GTPasa de baja afinidad (Barchfeld y Medzihradsky, 1984; Franklin and Hoss, 1984; Martínez-Peña y Garzón, 1993; Garzón y col., 1997). De esta manera y con el fin de comprobar la incorporación

funcional de las subunidades $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas a la cascada de señales, se determinó en ratones *knock-down* de $G\alpha_{i2}$ la capacidad de esta proteína, administrada vía i.c.v., para restablecer la potencia de diversos agonistas opioides y no opioides sobre la actividad GTPásica de alta afinidad en membranas de cerebro de estos animales.

La estructura seleccionada para llevar a cabo este estudio fue la sustancia gris periacueductal (SGPA), la cual juega un importante papel en la mediación de la analgesia supraespinal de los opioides administrados i.c.v. (Yaksh y col., 1976; Jensen y Yaksh, 1986). Tras disminuir la síntesis de la $G\alpha_{i2}$ con un ODN dirigido a una secuencia específica de nucleótidos del ARNm de la proteína, se determinó en membranas P_2 procedentes de la SGPA, los efectos sobre la GTPasa del ligando selectivo de los receptores opioides μ DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵]-encefalina), el agonista δ DPDPE ([D-Pen^{2,5}]-encefalina), el agonista del receptor de adenosina A_1 R-PIA (R-N⁶-(fenilisopropil) adenosina), y el agonista α_2 -adrenérgico clonidina.

Las membranas P_2 , preparadas como se describen en el apartado 2.6.1 de Materiales y Métodos, fueron preincubadas en frío (2 horas a 4°C) con los distintos agonistas para equilibrar estas sustancias con sus receptores, seguida de una incubación de 20 minutos a 37°C en presencia de GTP 1 μ M para determinar la actividad GTPásica. En estas condiciones experimentales, la actividad basal de la GTPasa de alta afinidad determinada en presencia de 100 μ M de GTP fue de 105 ± 8 pmoles/mg/min en el PAG. Los resultados se expresan como % actividad basal de la GTPasa de alta afinidad, y fue calculada por sustracción de la actividad GTPásica de baja K_m , observada en presencia de una concentración alta de GTP (100 μ M), de la hidrólisis observada a una concentración baja de GTP (1 μ M).

En esta situación de deterioro de la transducción los distintos agonistas no fueron capaces de estimular la hidrólisis del GTP (Figura 42). Por el contrario, la administración i.c.v. de una dosis única de 12 pmol/ratón de la $G\alpha_{i2}$ -miristoilada, en ratones *knock-down* de esta proteína restablece la potencia de DAMGO 100 nM, DPDPE 100 nM, R-PIA 10 μ M y clonidina 100 nM para incrementar *in vitro* la hidrólisis de GTP en membranas procedentes de la SGPA de estos animales.

Además, la administración i.c.v. de la $G\alpha_o$ miristoilada provocó una recuperación parcial de la hidrólisis de GTP promovida por DPDPE y clonidina (Figura 42), que fue debida a las distintas características cinéticas de los subtipos de proteínas G, en cuanto a capacidad de unión y liberación de nucleótidos de guanina (Carty y col., 1990; Casey y col., 1990; Linder y col., 1990). Por tanto, la eficacia de un agonista sobre un receptor, medida por la estimulación de la actividad GTPásica que éste provoca, varía en función de las proteínas transductoras disponibles en ese momento en esa zona en concreto.

La especificidad de este efecto se analizó tras inhibir la actividad GTPásica de las subunidades $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas, al incubarlas durante 30 minutos a 25°C, previo a su administración i.c.v., con análogos no hidrolizables del GTP, GTP γ S, o del GDP, GDP β S, que mantienen desreguladas las proteínas G de forma continuada (Stryer y Bourne, 1986).

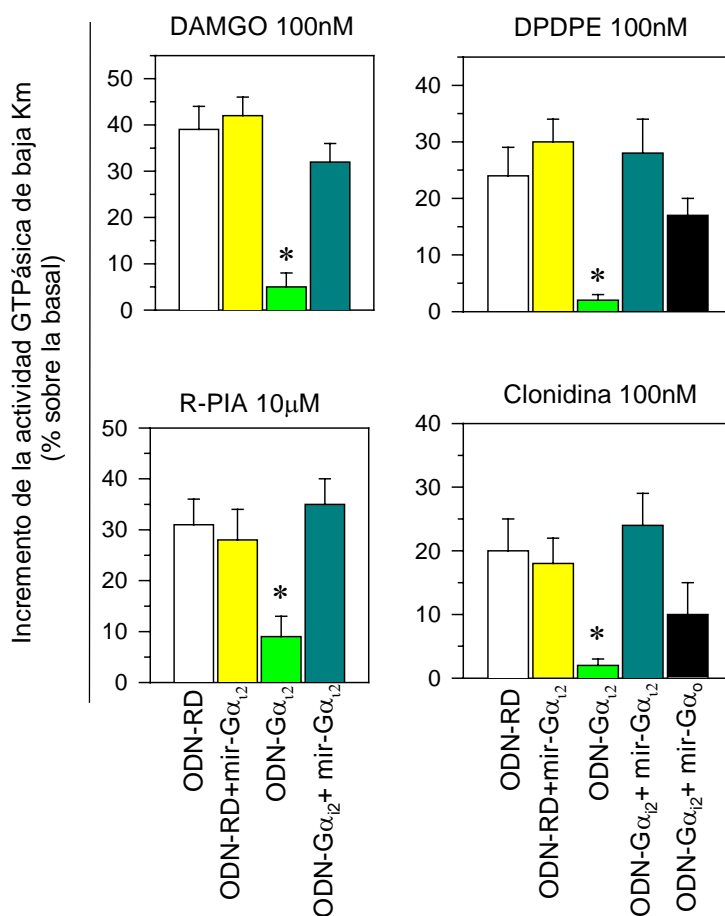


Figura 42. Efecto de la administración i.c.v. de proteínas $G\alpha_{i2}$ miristoiladas sobre la estimulación de la actividad GTPásica de alta afinidad promovida por distintos agonistas en la SGPA de ratones *knock-down* de $G\alpha_{i2}$. La actividad enzimática basal fue de 105 ± 8 pmol/mg/minuto. Cada valor representa la media \pm E.S.M. de tres determinaciones. * Diferencias significativas con respecto al grupo control, que recibió el ODN-RD. Análisis de varianza (Anova) seguido del test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$.

4.2.- Caracterización del mecanismo de entrada de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas en las células del SNC.

Con el fin de caracterizar el mecanismo de entrada implicado en el reconocimiento e internalización de las proteínas $G\alpha$, hemos analizado la participación en estos procesos de unas invaginaciones de la membrana plasmática, denominadas caveolas, donde se alojan y acoplan diversos componentes de la señalización celular, entre ellos las subunidades α de las proteínas G (Li y col., 1996; Couet y col., 1997; García-Cardena y col., 1997; Cameron y col., 1997; Okamoto y col., 1998).

4.2.1.- Implicación de las caveolas en la internalización de las $G\alpha_{i2}$ exógenas.

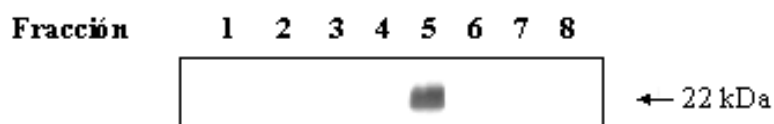
En este trabajo, la participación de las caveolas en el proceso de internalización de $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas ha sido analizada en astrocitos de rata. La fase preliminar del estudio consistió en el aislamiento de las caveolas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa según su velocidad de sedimentación, y posterior identificación con un anticuerpo dirigido a una secuencia N-terminal de la caveolina, principal proteína de las caveolas, y detección con un microscopio electrónico que revela su morfología.

El análisis por *Western-blotting* de las distintas fracciones recogidas de un gradiente lineal de sacarosa (5-30%), confirmó la abundancia de la caveolina en una banda comprendida entre el 10-20% de sacarosa (Figura 43A), en la que, como ha sido descrito por Sargiacomo y colaboradores (1993), se purifican los complejos insolubles en Triton X-100, entre los que se encuentran las caveolas.

Posteriormente, para analizar en detalle su morfología, esta banda fue precipitada y procesada para el análisis por microscopía electrónica, revelándose la presencia de unas invaginaciones de la membrana plasmática, con un diámetro de 50-

100 nm, entre los complejos insolubles en Triton X-100 que corresponden a las caveolas (Figura 43B).

(A)



(B)

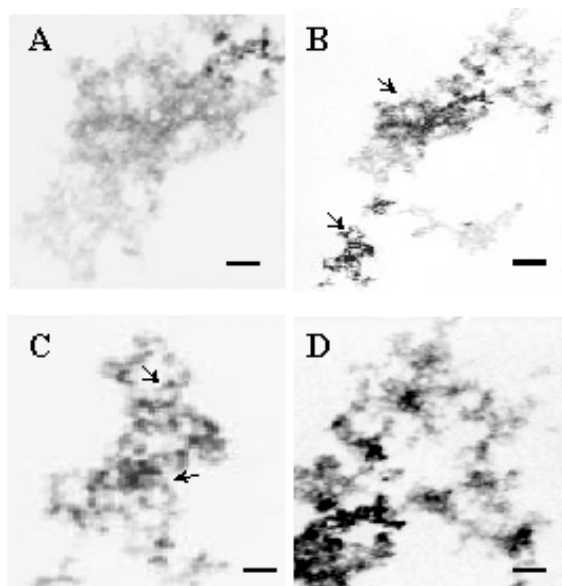


Figura 43. (A) Inmunodetección de caveolina en las fracciones recogidas del gradiente lineal de sacarosa (5-30%). Los astrocitos fueron solubilizados en NP-40, como se describe en el apartado 2.6.2 de Materiales y Métodos, y sometidos a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El análisis por *Western blot* de las distintas fracciones reveló la presencia de caveolina en la fracción 5 (10-20% de sacarosa), que fue procesada para su análisis por microscopía electrónica. (B) Visualización de los complejos insolubles en Triton X-100 con microscopio electrónico. Las distintas imágenes corresponden a distintos campos de dos cortes ultrafinos teñidos con acetato de uranilo y nitrato de plata. Las caveolas aparecen como vesículas cerradas de 50-100 nm de diámetro. Escala 100 nm.

A continuación, y para determinar la contribución de las caveolas en la internalización de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas, cultivos de astrocitos se trataron durante 16 horas con $G\alpha_{i2}$ miristoiladas unidas a una sonda fluorescente (FLUOS) para permitir su localización. Las caveolas fueron obtenidas por el mismo procedimiento empleado anteriormente, y tras su fijación con 4% de paraformaldehído, se montaron en

portas gelatinizados con tampón fosfato-glicerol para su observación al microscopio confocal.

Los resultados obtenidos tras la exploración con el microscopio confocal, revelan la presencia de fluorescencia asociada con las subunidades $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas (Figura 44), que confirman la implicación de las caveolas en el proceso de internalización de proteínas recombinantes $G\alpha_{i2}$. Para la captación de las imágenes se utilizó un objetivo de 16, excepto en las observaciones más minuciosas (objetivo de 63), manteniéndose los parámetros seleccionados en virtud de una buena visualización de las imágenes y que corresponden a las siguientes medidas: pinhole 90, voltaje 589 y fondo 0.

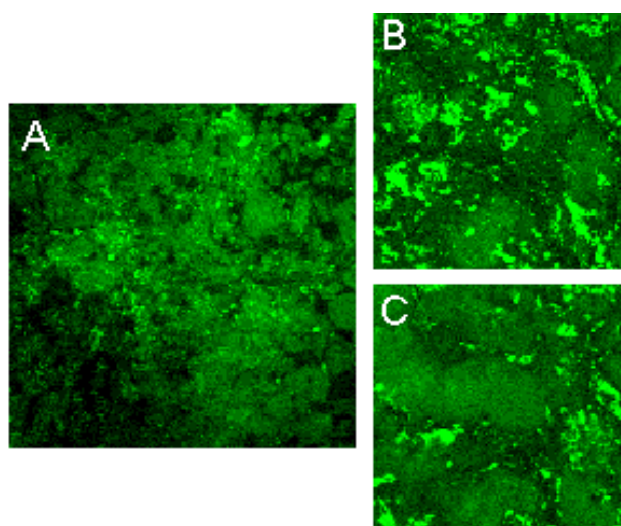


Figura 44. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las caveolas obtenidas a partir de astrocitos de rata en cultivo, y que han sido tratados *in vivo* con la subunidad $G\alpha_{i2}$ -miristoilada marcada con fluoresceína. (A) Corresponde a un campo general de la preparación, obtenida con el objetivo 16. (B) y (C) son distintas secciones de una zona de (A) ampliada, obtenidas con el objetivo de 63, y que nos permiten apreciar como la subunidad $G\alpha_{i2}$ -FLUOS se localiza en el interior de las caveolas.

4.2.2.- Saturabilidad del mecanismo de entrada de las $G\alpha_{i2}$ exógenas.

Con el fin de caracterizar aún más el mecanismo de entrada de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas, estudiamos la saturabilidad del mecanismo de transporte. Para ello, cultivos de astrocitos crecidos sobre cubres de 10 mm de diámetro pretratados con poli-L-lisina, e introducidos en placas de 12 pocillo (2 cubres por pocillo), fueron incubados *in vivo*, en presencia de 1 μ l (0,1 μ g/ μ l) de $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas no

marcadas, en 600 μ l de BME/F-0,1% durante 30 minutos, 2, 6 ó 12 horas. Tras sucesivos lavados con el medio de cultivo, las células fueron tratadas ahora y durante 16 horas con $G\alpha_{i2}$ miristoiladas previamente ligadas a un fluoróforo (FLUOS).

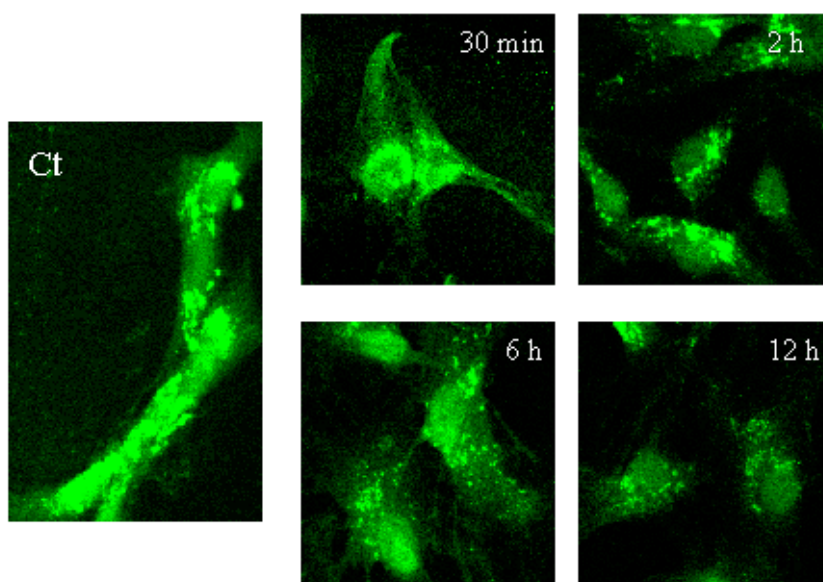


Figura 45. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (objetivo 40 y 1,63 de zoom), correspondientes a diferentes poblaciones de astrocitos incubados 16 horas en presencia de $G\alpha_{i2}$ -FLUOS, previo tratamiento durante 30 minutos, 2, 6 y 12 horas con $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas. Ct es el control representativo de todos los tiempos de tratamiento, obtenido tras 16 horas de tratamiento con $G\alpha_{i2}$ -FLUOS, en células previamente incubadas con BME/F-0,1% sin $G\alpha_{i2}$ recombinantes. Las imágenes muestran la variación en la internalización de las $G\alpha_{i2}$ recombinantes, según los distintos tiempos de tratamiento, así como la distribución subcelular de las $G\alpha_{i2}$ miristoiladas exógenas, incorporadas en los astrocitos.

La cuantificación de la señal fluorescente de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal (Figura 45), con el CYTOFLUOR (2300 System, Millipore), reveló cambios significativos de la intensidad de señal, que fueron del orden del $40-45 \pm 5\%$ menor en los astrocitos que fueron previamente tratados con las $G\alpha_{i2}$ exógenas no marcadas durante 6 y 12 horas, respectivamente. Estos resultados nos indican que la internalización de las $G\alpha$, es un proceso saturable y controlado por la célula, ya que al comparar las cinéticas de entrada de los distintos tiempos de tratamiento, se observa que los astrocitos sólo son capaces de incorporar cierta cantidad de $G\alpha_{i2}$ exógenas.

Discusión

De los procesos de regulación de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) ninguno ha recibido tanta atención como la desensibilización que conduce a la reducción de la señal iniciada por los agonistas. Este proceso se ha caracterizado principalmente a nivel de la molécula del receptor, describiéndose mecanismos que operando a nivel transcripcional, translacional, alteran los niveles de la proteína. Otros mecanismos, implican modificaciones covalentes de los receptores (su fosforilación mediante quinasas específicas), así como regulación de su asociación con otras proteínas (unión de β -arrestinas) y su localización subcelular (*Hausdorff y col., 1990; Ferguson y col., 1996; Koenig y Edwardson, 1997*). Sin embargo, en los últimos años son cada vez más frecuentes los estudios que indican que la pérdida de señalización de receptores G (en nuestro caso particular los opioides) puede también producirse sin el concurso de fosforilación, internalización y reactivación (*Law y col., 2000*). Por consiguiente, el receptor constituye la puerta de entrada de las señales de los agonistas, sin embargo, los mecanismos responsables de su pérdida de eficacia, desarrollo de taquifilaxia o tolerancia pueden implicar también mecanismos postreceptor en el entorno de las proteínas transductoras G y sistemas efectores.

En este sentido, la excelente capacidad de los opioides tipo morfina para producir analgesia presenta claras limitaciones, ya que a corto plazo suelen aparecer pérdidas de potencia como consecuencia de los fenómenos de taquifilaxia. Es sabido que este problema inicial se puede compensar aumentando la dosis del opioide para así conseguir los efectos deseados, pero si tal actuación se prolonga en el tiempo, hay una gran probabilidad de que se desencadenen una serie de procesos neurobiológicos adaptativos que conocemos como tolerancia y dependencia, tanto física como psíquica, a estas sustancias.

Los resultados obtenidos en una cepa de ratones *knock-out* del receptor opioide μ , demuestran que este receptor es el que da origen a la analgesia, y a los efectos adictivos de la morfina (*Matthes y col., 1996; Sora y col., 1997*). En estos animales se mantienen los efectos antinociceptivos de la deltorfina II, agonista selectivo de los receptores δ , (*Matthes y col., 1998; Hosohata y col., 2000*). Estos hallazgos confirman

lo obtenido con la administración subcrónica de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) frente a los ARNm que codifican los receptores μ y δ , y bloquean selectivamente su síntesis (*Sánchez-Blázquez y col., 1997; 1999*). Por tanto, el receptor μ se presenta como el punto crucial para producir la deseada antinocicepción opioide, así como un lugar importante sobre el que actuar para contrarrestar la génesis de la tolerancia y dependencia. Lógicamente, la coincidencia de origen de estos efectos de calidad contrapuesta en el mismo receptor obliga a plantear estrategias que permitan su control diferencial.

Con este objetivo, este trabajo aborda el estudio de los procesos adaptativos del sistema de transducción del receptor opioide μ , que se originan como consecuencia de la exposición aguda y crónica a los opioides.

1.- Participación de las proteína quinasas C en los procesos de desensibilización del receptor opioide.

En líneas celulares y en sistemas reconstituidos, pero no en el sistema nervioso, se ha descrito una fosforilación basal del receptor opioide μ (*Arden y col., 1995; Zhang y col., 1996*), que se incrementa en presencia de morfina, proceso que parece implicado en la desensibilización del receptor. Se cree que la activación de la proteína quinasa C (PKC) juega un papel importante en la rápida desensibilización de receptores opioides (*Mestek y col., 1995; Smart y Lambert, 1995; Xiang y col., 2000; Narita y col., 2001; Ueda y col., 2001*), desacoplamiento entre receptores opioides y proteínas G (*Lin y col., 1994, Fukushima y col., 1994*), y en el desarrollo o expresión de dependencia opioide (*Tokuyama y col., 1995; Ventayol y col., 1997; Escribá y García-Sevilla, 1999*). En tratamientos crónicos, la estimulación de la actividad de la PKC en el sistema nervioso, transcurre paralela al desarrollo de tolerancia a los efectos analgésicos opioides (*Narita y col., 1994; Mao y col., 1995; Mayer y col., 1995*) y el bloqueo de la actividad de la enzima previene la aparición de tolerancia (*Narita y col., 1994; 2001; Mao y col., 1995*).

La proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina tipo II (CAMKII) también parece modular la desensibilización de receptores μ tras exposición prolongada a opioides

(Mestek y col., 1995; Koch y col., 1997). Asimismo, se ha descrito regulación de la fosforilación de receptores δ y κ por la quinasa de receptores acoplados a proteínas G, GRK2 (Raynor y col., 1994; Pei y col., 1995; Zhang y col., 1998), y se ha visto un incremento en la inmunorreactividad para esta proteína en locus coeruleus de animales tratados crónicamente con morfina (Terwilliger y col., 1994). Estudios más recientes ponen de manifiesto la implicación de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) en la desensibilización e internalización del receptor opioide (Polakiewicz y col., 1998).

Además, la administración crónica de opioides produce una marcada hiperactividad del sistema de transducción adenilato ciclasa (AC)/AMP cíclico (AMPC)/proteína quinasa A (PKA). Las consecuencias de este aumento en la fosforilación de proteínas y expresión génica parecen ser mecanismos claves subyacentes a la tolerancia y dependencia opioide (Nestler y col., 1994; Nestler y Aghajanian, 1997). En este sentido, la proteína quinasa C ha sido implicada en la modulación *in vitro* de varios pasos de este sistema, como la regulación de la fosforilación e inactivación funcional de las proteínas G_i (Katada y col., 1985; Pyne y col., 1989; Strassheim y Malbon, 1994), con el consecuente aumento de la actividad de la AC (Yoshimasa y col., 1987).

En nuestro estudio, el desarrollo de la tolerancia y dependencia física, tras tratamiento con morfina crónica, fue acompañado con cambios desiguales en los niveles citosólicos de las distintas PKCs. En la corteza cerebral de ratones tolerantes, la inmunorreactividad de la PKC α aumento, mientras que los niveles de PKC β I, PKC β II, PKC γ y PKC ϵ disminuyeron. Los cambios asociados a los niveles de PKC α , PKC γ y PKC ϵ persisten en ratones abstinentes, los cuales muestran una respuesta normal a los opioides.

Hemos de considerar que la mayoría de las isoenzimas de PKC inactivas se localizan en la fracción citosólica o asociadas con estructuras subcelulares como el aparato de Golgi. Estas probablemente se ligan a proteínas (receptores) que se denominan RICKs (de *Receptor Inactive C-Kinase*) (Mochly-Rosen y col., 1990). Se ha descrito, que tras su activación, la PKC se trasloca del citosol a la membrana plasmática

(Kraft y Anderson, 1983), aunque algunas isoenzimas también se localizan en el citoesqueleto (Mochly-Fosen y col., 1990; Kiley y Jaken, 1990), núcleo (Cambier y col., 1987) u otras estructuras celulares (Rotem y col., 1990). Cambios conformacionales asociados con su activación, permiten su unión a receptores para la quinasa C activa (RACK de *Receptor Active C-Kinase*), que son proteínas del complejo multi-enzimático AKAP79 (Klauch y col., 1996), las cuales modulan su localización celular (Mochly-Rosen y col., 1991) y estabilizan la forma activa de PKC facilitando el acceso de sus sustratos (Ron y Mochly-Rosen, 1995). Entre ellas, se encuentra la RACK1, que presenta alta homología con la subunidad β de las proteínas G, y se liga a la proteína quinasa C con alta afinidad y especificidad (Ron y col., 1994).

Las variaciones de la inmunorreactividad de RACK1 han sido también descritas en la corteza cerebral (no fraccionada) de ratas tolerantes a la morfina y durante el síndrome de abstinencia (Escribá y García-Sevilla, 1999). Nuestros datos establecen, que la RACK1 se encuentra en ambas fracciones, citosol y de membrana, de la corteza cerebral de ratón, y confirman una disminución de RACK1 en el citosol y aumento significativo de sus niveles en la fracción de membrana de esta estructura cerebral, como consecuencia del desarrollo de la tolerancia-dependencia a la morfina crónica. Este hecho debe implicar la traslocación de la proteína quinasa C a la membrana celular, al encontrarse ligada a RACK1.

En la corteza cerebral de ratones abstinentes, los cambios en los niveles de RACK1 persistieron y fueron aún mayores, sugiriendo que en estos animales ciertas isoenzimas de proteína quinasa C son todavía activadas y traslocadas a la membrana celular donde desempeñan la actividad quinasa. Sin embargo, los cambios que observamos en la inmunorreactividad asociada a la membrana plasmática de las distintas PKCs objeto de estudio, no fueron significativos en los ratones tolerante/dependientes a morfina y/o abstinentes. Esto puede ser debido a que una porción significativa de las isoenzimas de proteína quinasa C está constitutivamente presente en la membrana de varios tipos celulares (Huang y col., 1987), y probablemente la PKC que se trasloca del citosol a la membrana, en respuesta a la morfina crónica, es sólo una pequeña parte del total asociado a la membrana celular, lo

que justifica los pequeños incrementos observados, en el presente trabajo, de los niveles de PKC α , PKC β I, PKC γ y PKC ϵ en la fracción de membrana de la corteza cerebral de estos animales.

Además, numerosos trabajos indican que los cambios observados en los niveles de las distintas proteína quinasas C dependen de la estructura neural estudiada. En este sentido, se ha descrito, un incremento de la inmunorreactividad de PKC γ en la membrana de los cuerpos neuronales de la medula espinal de ratas tolerante/dependientes a la morfina (*Mao y col., 1995*). Este tratamiento también aumenta la actividad de las PKCs citosólicas independientes de Ca²⁺, en bulbo raquídeo pero no en la corteza o tronco cerebral de ratas. Tampoco se detectaron cambios en la actividad de estas isoenzimas asociada con membranas celulares (*Narita y col., 1994*). Por otro lado, la actividad ligada a la membrana plasmática de las proteína quinasas C dependientes de Ca²⁺ aumento en la corteza y tronco cerebral pero no en bulbo raquídeo (*Narita y col., 1994*).

En conjunto estos trabajos establecen que el desarrollo de la tolerancia a la morfina promueve la traslocación de las proteína quinasas C dependientes de Ca²⁺ a la membrana y el aumento de las isoenzimas independientes de Ca²⁺ en el citosol de ciertas regiones neurales. Sin embargo, en el presente trabajo la morfina crónica aumenta los niveles citosólicos de PKC α dependiente de Ca²⁺, en la corteza cerebral del ratón. Estos resultados no son contradictorios, y pueden ser interpretados como un aumento de los niveles de esta isoenzima en ambas fracciones citosol y membrana.

También hemos de considerar algunos trabajos en los que se describe una disminución de la inmunorreactividad asociada a PKC α en la corteza cerebral de ratas tolerantes a la morfina crónica, administrada por vía intraperitoneal durante cinco días consecutivos (*Ventayol y col., 1997; Escribá y García-Sevilla, 1999*). Las variaciones en las especies, la duración del tratamiento crónico (*Adams y Holtzman, 1990*), la frecuencia en la administración del opioide y la dosis empleada (*Mucha y col., 1971; Fernandes y col., 1982; Schuh y col., 1996*) influyen en la tolerancia a los opioides y son responsables de estas diferencias. Un estudio reciente demuestra que la

administración intratecal repetida del DAMGO, agonista del receptor opioide μ , no produce cambios significativos en la fracción de membrana de la médula espinal de los niveles de las proteína quinasas convencionales, y que en ratones *knock-out* de PKC γ , este tratamiento, no causa la desensibilización del receptor inducida por el agonista (Narita y col., 2001). Estos hallazgos, asignan un papel esencial a la proteína quinasa γ en la regulación de la desensibilización homóloga del receptor opioide μ .

Por lo tanto, en nuestro estudio, la disminución que observamos en el citosol de los niveles de PKC β I, PKC β II, PKC γ y PKC ϵ en ratones tolerantes son consistentes con traslocaciones a la fracción nuclear o a la periferia celular (Disatnik y col., 1994). Las distintas proteína quinasas C pueden ser activadas por distintas vías de señalización (Hug y Sarre, 1993), y muestran diferente sensibilidad a sus reguladores y variaciones en su distribución celular y subcelular, que responden a los cambios adaptativos en los niveles citosólicos de estas PKCs, durante la administración crónica de opioides.

En este sentido, se conoce que en la acción de los opioides participan, entre otros mecanismos, la inhibición de la formación del AMPc, el cierre de canales de voltaje sensibles a Ca^{2+} , y la apertura de los canales de K^+ a través de la estimulación de las proteínas Gi/o (Childers, 1991). Además, los opioides activan la vía de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), en la que Raf-1 es activada en la membrana plasmática por la proteína Ras-GTP, y es fosforilada por diversas quinasas, incluidas tirosinas quinasas, PKA, Akt y PKC (Morrison y Cutler, 1997; Van Dijk y col., 1997; Marais y col., 1998). Asimismo, los opioides activan la fosfolipasa C (PLC) en muchas células y tejidos neurales (Mangoura y Dawson, 1993; Smart y col., 1995; Ueda y col., 1995). La activación de este enzima induce la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana, particularmente el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP $_2$), que origina dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP $_3$). El DAG activa la proteína quinasa C, mientras que el IP $_3$ se une a sus receptores citoplasmáticos y moviliza el Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Berridge, 1987; Fisher y col., 1992; 1993).

La elevación de los niveles de Ca^{2+} en el citosol, además de activar a la quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo II (CaMK II) (*MacNicol y Schulman, 1992; Schulman y Hanson, 1993*), promueve la traslocación de las proteína quinasas convencionales (PKC c) a la membrana celular, donde el DAG y la fosfatidilserina las activan. Mientras que la traslocación de las proteína quinasas nuevas (PKC n), entre ellas la PKC ϵ , es independiente del Ca^{2+} y debe implicar la acción de los esteres de forbol (*Hug y Sarre, 1993*).

Entre las proteína quinasas C convencionales, la PKC β es más sensible, que PKC γ y PKC α , a la activación por diacilglicerol en presencia de fosfatidilserina. Estas isoenzimas son moduladas por Ca^{2+} , y por tanto, también son sensibles a la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato, que en último termino moviliza el Ca^{2+} intracelular (*Newton, 1997*). Otros componentes del metabolismo de los glicerolípidos son activadores selectivos *in vitro* de ciertas isoenzimas de PKC: cardiolípidina activa PKC α , PKC β I y PKC ϵ , el ácido araquidónico y la lipoxina A activan la PKC β II, PKC γ y PKC ϵ , mientras que la PKC α puede ser activada por ácido araquidónico en presencia de Ca^{2+} .

En cuanto a su localización, todos los miembros de la familia de PKCs son expresados en el S.N.C. de mamíferos pero muestran una distribución celular y subcelular diferente (*Nishizuka, 1988; Tanaka y Saito, 1992*). Mientras que la PKC α es la isoenzima con una distribución tisular más amplia, la PKC γ sólo se localiza en médula espinal y cerebro, la mayoría concentrada en el hipocampo, corteza cerebral y complejo amigdalóide, la PKC ϵ sólo se expresa en cerebro, y PKC β II es más abundante en cerebro que PKC β I.

Al mismo tiempo, las isoenzimas de proteína quinasa C que son reguladas por distintos activadores se distribuyen de forma desigual en el S.N.C. (*Tanaka y Saito, 1992*), a nivel del tipo de célula y a nivel subcelular (*Jaken, 1996*), lo que sugiere que cada uno de los subtipos desempeña funciones distintas y selectivas en el proceso y modulación de las señales neuronales. Los procesos de fosforilación (autofosforilación)/defosforilación y la unión a proteínas reguladoras, determinan su

localización subcelular y los estados de activación/inactivación de las PKCs (Newton, 1997). Hay evidencias de que algunas isoenzimas se ligan a la proteína 14-3-3, una proteína ácida que participa en numerosas vías de señalización, entre las que se encuentran las vías de las proteínas G y Raf quinasas, control del ciclo celular y apoptosis (Acs y col., 1995; Meller y col., 1996; Yaffe y col., 1997; Van der Hoeven y col., 2000), o a los componentes del citoesqueleto como la actina (Lehel y col., 1995; Prekeris y col., 1996).

Probablemente, la *down-regulation* de las isoenzimas de PKC observada en nuestro estudio con el tratamiento crónico de morfina, es debido a la degradación proteolítica, que puede ser un proceso que previene la activación permanente de la quinasa. La activación prolongada de las proteína quinasas C y su traslocación a la membrana celular es un requisito previo para la proteólisis. Sin embargo, hay diferencias en la sensibilidad de las isoenzimas de PKC a la degradación proteolítica (Hug y Sarre, 1993). Algunos subtipos controlan la actividad de otras PKCs, las cuales no son capaces de iniciar la *down-regulation*, por ejemplo PKC γ y δ median la *down-regulation* de PKC ϵ en células de mamífero (Goode y col., 1995).

En resumen, la activación crónica del receptor opioide μ origina cambios sostenidos en los niveles de ciertas isoenzimas de proteína quinasas C y RACK1, que son más duraderos que la tolerancia y la dependencia física al opioide. Los niveles citosólicos de PKC β I y PKC β II están reducidos en la corteza cerebral de ratones tolerante/dependientes. Sin embargo, estos cambios no se observaron en ratones abstinentes, los cuales, generalmente, muestran respuestas normales a los opioides. Por el contrario, los niveles de PKC α , PKC γ y PKC ϵ variaron en ratones tolerante/dependientes y también en los abstinentes. En ambos grupos de animales, los niveles de RACK1 disminuyeron en el citosol, pero aumentaron en la fracción de membrana.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que las isoenzimas de PKCs están implicadas en la tolerancia y dependencia a la morfina crónica y también en los mecanismos adaptativos que conducen a la recuperación de la respuesta normal a los

opioides en ratones abstinentes. Por tanto, la regulación de su densidad en estructuras del S.N.C. supone un mecanismo molecular adaptativo del receptor opioide μ , que subyace a los procesos de tolerancia y dependencia. Además, la posible transmodulación (*cross-talk*) entre estas enzimas y el sistema de la adenilato ciclasa/AMP cíclico conduce al mejor conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la adición opioide.

Sin embargo, la implicación de las PKCs en la respuesta medida por el receptor opioide δ no está clara (*Pei y col., 1995; Narita y col., 1996*). En el presente trabajo, los niveles de varias PKCs fueron medidos en animales *knock-out* del μ , que han recibido un tratamiento crónico con deltorfina II, agonista selectivo de este receptor. Cambios en los niveles de PKC α , PKC β I, PKC β II y PKC γ fueron observados en la corteza cerebral de ratones *wild-type*, que expresan el genotipo salvaje, pero no en los ratones *knock-out*, carentes del receptor opioide μ . Estos resultados indican que la activación de PKC por deltorfina II precisa de receptores μ intactos (*Hutcheson y col., 2001*). Existe la posibilidad de que los receptores δ tengan efectos moduladores sobre la señalización de los μ en los animales *wild type*. Esta idea coincide con los resultados obtenidos con los antagonistas delta, los cuales mitigan la tolerancia producida por los agonistas del receptor μ (*Abdelhamid y col., 1991; Hepburn y col., 1997; Zhu y col., 1999*).

2.- Participación de las subunidades G α en los procesos de desensibilización del receptor opioide.

En la actualidad, el incremento en la fosforilación de los receptores opioides tras su estimulación por un agonista se ha asociado con los procesos de desensibilización (a corto plazo *-taquifilaxia-* y de larga duración *-tolerancia*). Sin embargo, ambos procesos no pueden ser originados por un único mecanismo ya que, en el caso de la taquifilaxia se produce una recuperación relativamente rápida que no puede asociarse ni a la síntesis de nuevos receptores (no hay aumentos de ARNm), y además el recambio de este receptor requiere más de 10 días (*Unterwald y col., 1995*), ni a una fosforilación/defosforilación rápida (que no ha sido descrita).

Por tanto la hipótesis de trabajo que planteamos considera que tras la activación del receptor por un agonista, puede producirse un empobrecimiento de proteínas G, localizado en el entorno del receptor, que sería la responsable de la aparición de taquifilaxia. Al cesar la activación las proteínas G se redistribuirían y los receptores opioides serían nuevamente funcionales. En el caso de una activación sostenida, las señales continuadas producidas por las $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ activas, traslocarían enzimas tipo proteína quinasas C o quinasas específicas de receptores G (GRK) desde el citoplasma a la membrana plasmática donde el empobrecimiento de proteínas G en el entorno del receptor privaría de protección frente a la fosforilación, que es responsable del desarrollo de la tolerancia-a largo plazo, y como se conoce es un proceso de muy lenta recuperación.

Sabemos que las proteínas G unen los receptores localizados en la superficie de la célula con los sistemas efectores intracelulares. Tras la activación de un receptor por un agonista se originan cambios en la proteína G que se disocia en la subunidad α unida a GTP y el complejo $\beta\gamma$, que son ahora capaces de regular la actividad de diversos sistemas efectores (Bourner; 1997). El **Laboratorio de Neurofarmacología del Instituto Cajal** ha sido pionero en demostrar que la administración *in vivo* de agentes capaces de alterar el tono funcional de las proteínas G: toxinas pertúsica y colérica (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1998), venenos peptídicos como el mastoparan (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1994); o anticuerpos generados frente a secuencias específicas de las subunidades α (α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , $\alpha_{x/z}$) (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1993; Garzón y col., 1994; Garzón, 1995; Sánchez-Blázquez y col., 1995) originan cambios diferenciales en el efecto antinociceptivo de una serie de opioides. El tratamiento con oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs) para bloquear la síntesis de los subtipos de proteínas G, produce idénticos resultados (Raffa y col., 1994; Standifer y col., 1996; Sánchez-Blázquez y col., 1995, 1998, 1999; Garzón y col., 2000). La administración de estos anticuerpos a ratones tolerante/dependientes a la morfina es capaz de reducir de forma significativa la severidad del síndrome de abstinencia (Sánchez-Blázquez y Garzón, 1994), reforzando la propuesta de que el complejo receptor opioide-proteína G es un lugar adecuado para la actuación terapéutica en los procesos de desensibilización.

Estudios realizados sobre cerebros de ratas tolerantes a la morfina han puesto de manifiesto cambios en los niveles de algunos subtipos de proteínas G. El tratamiento crónico con morfina, pero no el agudo, incrementa las inmunoreactividades de las subunidades $G\alpha_{i1/2}$, $G\alpha_o$ y $G\beta$ en el cerebro de rata (Nestler y col., 1989; Rasmussen y col., 1990; Escribá y col., 1994). El aumento en la abundancia de $G\alpha_{i1/2}$, $G\alpha_o$ podría compensar la *down-regulation* del receptor opioide μ y/o el desacoplamiento funcional del receptor que se observa en varios tipos de células y tejidos después de la administración crónica con morfina (Ulibarri y col., 1987; Puttfarcken y Cox, 1989; Werling y col., 1989). En cuanto al incremento en la densidad de las subunidades β de las proteínas G, este fue similar, en cuanto a intensidad se refiere, al observado en las proteínas $G\alpha_{i/o}$, y debe mantener la adecuada relación estequiométrica de las proteínas G heterotriméricas o de otros procesos reguladores (Escribá y col., 1994). Sin embargo, estos cambios de inmunoreactividad no se corresponden con modificaciones similares de los ARNm que codifican estas proteínas (Basheer y Tempel, 1993). Es por tanto, lógico asumir que no tanto el número de proteínas transductoras, sino su localización y/o estado funcional como mensajero intracelular son esenciales en los efectos agudos (analgesia) y crónicos (génesis y expresión de la dependencia) de los opioides.

En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado en roedores la captación de subunidades $G\alpha$ recombinantes desde el líquido cefalorraquídeo hacia el interior de células neurales (Garzón y col., 1999). Numerosos trabajos demuestran que las proteínas G se agrupan en unas invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática denominadas caveolas (Takashi y col., 1995; Parton y col., 1996). Estas estructuras facilitan la rápida transmisión de las señales celulares al acoplar eficientemente todos los elementos necesarios para la transducción de señales (Lisanti y col., 1994; 1995).

Las caveolas están presentes en la mayoría de las células, entre ellas los astrocitos (Cameron y col., 1997; Okamoto y col., 1998), y son especialmente abundantes en células endoteliales, fibroblastos, adipocitos y células del músculo liso (Parton, 1996). El tratamiento de los astrocitos con filipin III, capaz de alterar el colesterol, principal componente lipídico de las caveolas, o con un ODN dirigido a bloquear la síntesis de caveolina, atenúa fuertemente la entrada de $G\alpha_{i2}$ en estas células.

El presente estudio corrobora la implicación de las caveolas en la internalización de las subunidades $G\alpha_{i2}$ miristoiladas (previamente marcadas con fluoresceína), al detectar en ellas, la inmunoseñal fluorescente tras el tratamiento de los astrocitos con estas proteínas. Además, el análisis realizado mediante microscopía confocal muestra que la internalización de las subunidades $G\alpha$ -miristoiladas exógenas de las proteínas G es un mecanismo saturable, lo que confirma la especificidad de este proceso.

En ausencia de deterioro de la transducción, las $G\alpha$ exógenas no amplifican las señales originadas por los agonistas, pero sí lo hacen reparando situaciones en las que se han dañado las proteínas G endógenas, por ejemplo, tras la acción de toxinas bacterianas (toxina pertúsica -PTX) o reducción de síntesis de $G\alpha$ con ODNs dirigidos a secuencias específicas de sus ARNm. Igualmente, las pérdidas de efectos agonistas por reducción experimental del número de receptores no se suplen con estas $G\alpha$ exógenas.

Estas perspectivas, que trascienden el ámbito del sistema opioide, se hacen comunes a todos los receptores acoplados a proteínas G. En el presente trabajo se demuestra como la administración *in vivo* de subunidades $G\alpha_{i2}$ exógenas a ratones *knock-down* de esta proteína también restablece la potencia de otros agonistas opioides DAMGO (agonista del receptor μ), DPDPE (agonista del δ), así como de la clonidina que es un agonista α_2 -adrenérgico, y del agonista del receptor A_1 de adenosina, R-PIA, para incrementar *in vitro* la hidrólisis de GTP en membranas de la sustancia gris periacueductal de ratón.

Por consiguiente, estas observaciones proporcionan una evidencia farmacológica de la incorporación funcional de las subunidades $G\alpha$ exógenas a la cascada de señalización iniciada en el receptor. Este hecho se corrobora tras comprobar que las subunidades $G\alpha_{i2/o}$ exógenas son incapaces de regular la activación de los receptores por los agonistas, cuando se encuentran unidas a los análogos no hidrolizables del GTP ($GTP\gamma S$) o del GDP ($GDP\beta S$), los cuales impiden la asociación de la $G\alpha$ con los dímeros $\beta\gamma$ (Lambright y col., 1994), o estabilizan la conformación del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$, respectivamente (Wong y col., 1985; McArdle y col., 1988).

Otro hecho de especial relevancia se observa en ratones *knock-down* de $G\alpha_{i2}$, en los cuales la administración de otro tipo de subunidad α , en nuestro caso la $G\alpha_o$, parcialmente restablece la función de las proteínas $G\alpha_{i2}$. Después de la inactivación de las proteínas G_i/o por tratamiento con PTX, combinaciones de las subunidades $G\alpha$ de estas proteínas conducen a una mejor recuperación de la función analgésica opioide que con la administración de una sola clase de proteína G. No obstante, no debemos olvidar que las proteínas G muestran variaciones en el acoplamiento a receptores y en la manera en la cual regulan los sistemas efectores (*Neer, 1995; Garzón y col., 1998*). Así, en situaciones en las que hay un déficit en una clase de proteína G, por ejemplo la $G\alpha_{i2}$, la administración exógena de este tipo de α recupera por sí sola la eficacia de los agonistas para inducir la hidrólisis del GTP, observándose una mejoría parcial de la función de las proteínas G_{i2} , cuando lo que se administra es otra proteína como la $G\alpha_o$.

Es interesante la observación de que las $G\alpha$ exógenas prácticamente no alteran la función normal de los receptores μ y δ opioides, y del receptor α_2 -adrenérgico, tanto en la producción de analgesia como en la hidrólisis del GTP. Este efecto también se observa en situaciones en las que la disponibilidad del receptor opioide μ se reduce con el antagonista irreversible β -funaltrexamina o con el correspondiente ODN que reduce la expresión de dicho receptor (*Sánchez-Blázquez y col., 1997; Garzón y col., 1999*). Por tanto, se sugiere que en situaciones de correcto funcionamiento, la relación receptor-proteína G debe ser óptima, de forma que no se dispone de $\beta\gamma$ libres, ya que la aportación de más subunidades $G\alpha$ no supone una mejora en la potencia de los agonistas.

Además, en situaciones en las que la acción de una dosis analgésica de un opiáceo, como la morfina, acarrea pérdidas en la potencia de dosis sucesivas (taquifilaxia) o cuando se administran en el intervalo de varias horas (tolerancia aguda), las $G\alpha$ exógenas son capaces de prevenir e incluso revertir la aparición de taquifilaxia (*Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001*). Se sugiere que tras la acción de los agonistas y activación de $G\alpha$ -GTP, se produce una reducción progresiva de proteínas G triméricas funcionales en el entorno de los receptores opioides, de forma que los receptores

activados por el agonista no encuentran forma de señalizar y pasan a ser *receptores silentes*, lo que origina que la respuesta sea cada vez más débil (taquifilaxia).

Así, para reconstituir un número suficiente de *receptores activos*, es necesario su acoplamiento con las proteínas G triméricas ($G\alpha\beta\gamma$). Por consiguiente, la $G\alpha$ inactiva ($G\alpha$ -GDP) necesita ligarse a $G\beta\gamma$, lo que dependerá de la velocidad de hidrólisis del GTP de la $G\alpha$ activa ($G\alpha$ -GTP). En este sentido, la aportación de $G\alpha$ exógenas también logra la rápida reversión del receptor al estado activo, al unirse a los dímeros $G\beta\gamma$ libres y reconstituir el heterotrímero funcional.

Por el contrario, la tolerancia a largo plazo, que conlleva la fosforilación del receptor (*receptor desacoplado*), no es sensible al aporte de $G\alpha$ exógenas, y se puede afirmar que la potencia analgésica y los efectos adictivos de los opioides, dependen tanto del correcto funcionamiento de sus receptores específicos, como del estado funcional de las proteínas G.

Podemos establecer por tanto, que la administración exógena de estas subunidades puede ser una valiosa herramienta a la hora de recuperar la funcionalidad de un sistema en situaciones de taquifilaxia o también en la fase de postdependencia, y se plantea la posibilidad de que en las acciones de algunos reguladores fisiológicos de proteínas G puedan residir los mecanismos que acarrear la desensibilización de receptores independiente de su fosforilación (taquifilaxia) (*Potenza y col., 1999; Garzón y col., 2001; Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001; Taylor y Fleming, 2001*).

Además de restaurar farmacológicamente la calidad de los efectos mediados por receptores G, cuando la transducción asociada sufre ciertas alteraciones funcionales, la administración de $G\alpha$ sirve para discriminar disfunciones causadas por alteraciones en la transducción, de aquellas debidas a perturbaciones a nivel del receptor de membrana.

3.- Participación de los reguladores fisiológicos de la función de las proteínas G en la desensibilización del receptor opioide.

Se ha descrito la presencia de proteínas capaces de modular la función de las proteínas G denominadas *proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G* (RGS), que aceleran la hidrólisis de GTP a GDP (Berman y Gilman, 1998; Hepler, 1999). Otra de estas familias está integrada por la fosducina y las *proteínas tipo fosducina* (PhLP) (Miles y col., 1993; Shcröder y Lohse, 1996), que ejercen un control sobre las subunidades $G\beta\gamma$ liberadas tras la disociación de las $G\alpha$ -GTP activas por agonista-receptor. La unión de estas proteínas a las $G\beta\gamma$ libres proporciona una cierta protección frente a enzimas con actividad quinasa (*G-coupled Receptor Kinases* -GRK), que actúan uniéndose a estos dímeros y desde aquí, por fosforilación, inactivan a los receptores ocupados por el agonista. El retorno de $G\alpha$ -GTP a $G\alpha$ -GDP desde las proteínas RGS y/o efectores libera a las $G\beta\gamma$ de su unión a PhLP y reconstituye las proteínas G heterotriméricas funcionales para seguir transmitiendo las señales de los complejos agonista-receptor hacia el interior celular.

3.1.- Participación de las proteínas RGS en los procesos de desensibilización del receptor opioide.

Las proteínas RGS o reguladoras de la señal de proteínas G, constituyen una familia de proteínas de gran diversidad funcional con un dominio común de ~120 aminoácidos (dominio RGS), que es el responsable de la interacción con la $G\alpha$ (Druey y col., 1996; Koelle y Horvitz, 1996; Siderovski y col., 1996). Estas proteínas regulan la función de las $G\alpha$ (de las familias G_i , G_o y G_q) por activación de la actividad GTPasa intrínseca de estas subunidades, limitando el tiempo de vida media de unión de $G\alpha$ con GTP (Dohlman y Thorner, 1997; Hepler, 1999). Además, ciertas RGS han sido propuestas como reguladores negativos en la señalización de los receptores acoplados a las proteínas G, ya que cuando se unen a las subunidades $G\alpha$ inhiben competitivamente su interacción con el efector (Tesmer y col., 1997). En adición, durante el tiempo que la subunidad $G\alpha$ está unida a la proteína RGS no es posible la reagrupación del hetrotrímero ($G\alpha\beta\gamma$), lo cual reduce el número de proteínas G que pueden ser reguladas por los receptores (Dohlman y col., 1996, 1997; Bünemann y Hosey, 1998; Hepler,

1999) y determina la porción de receptores G desensibilizados (Neil y col., 1997; Chuang y col., 1998; Tseng y Zhang, 1998; Diversé-Pierluissi y col., 1999; Potenza y col., 1999).

Numerosos estudios *in vitro* describen la selectividad en la interacción con los distintos tipos de $G\alpha$ de las distintas RGS. Hasta la fecha, ninguna de las proteínas RGS descritas actúan como GAPs (de *GTPase-accelerating protein*) para las G_s (Natochin y Artemyev, 1998). Algunas, como por ejemplo la RGS4, no muestran preferencia por las subunidades α de las proteínas G_i o G_q , sin embargo, otras como la RGSZ1 presenta gran selectividad por la $G\alpha_z$ (Wang y col., 1998), la RGS2 por G_{i1} y G_q (Ingi y col., 1998) y la RGS9-1 por $G\alpha_t$ (Skiba y col., 1999).

Con estas propuestas, evaluamos la participación de algunas de estas proteínas reguladoras en los procesos de desensibilización del receptor opioide μ , tolerancia a corto plazo o taquifilaxia, estudiando los cambios inducidos en la analgesia opioide. Así, sabiendo que las proteínas G, $G_{x/z} \geq G_{i2} > G_{i3} >> G_q$, son reguladas, con este orden de participación, en la producción de este efecto (Garzón y col., 1998), comprobamos que la reducción en la expresión de RGS2 y RGS3 con ODNs específicos frente a sus ARNm, atenúa el efecto antinociceptivo producido por la morfina. Sin embargo, los animales que recibieron ODNs frente a RGS4, RGS7, RGS9, RGS12, RGS14 o RGS16 respondieron con un aumento en la potencia y en la duración del efecto analgésico. Estos resultados ponen de manifiesto que según el tipo de proteína RGS de que se trate se puede modular en una u otra dirección la duración y amplitud de la respuesta fisio/farmacológica de los receptores opioides.

Con estos resultados centramos nuestro estudio en dos RGS con acciones contrapuestas en la analgesia opioide, la RGS2 y la RGS9. En una primera aproximación, verificamos la eficacia y selectividad de los ODNs dirigidos a disminuir su síntesis, los cuales no alteraron los niveles de otras proteínas requeridas en las vías de señalización de los receptores opioides μ : subunidades $G\alpha_{i2}$ y $G\beta_{1/2}$. Los estudios de unión con ligandos radiactivos llevados a cabo en tejidos obtenidos de animales

sometidos a tratamiento subcrónico con estos ODNs, tampoco revelaron variaciones en el número de receptores μ , ni en la afinidad de los agonistas (*Garzón y col., 2001*).

La RGS9 presenta dos variantes que derivan de lecturas alternativas de un mismo gen: la RGS9-1 y la RGS9-2, que difieren en la longitud de su secuencia aminoacídica (484 y 674 aminoácidos, respectivamente) y en su distribución tisular. RGS9-1 se localiza en retina y actúa como GAP (proteína activadora de GTPasa) de la $G\alpha_t$, donde acelera la recuperación de la visión, y glándula pineal (*Chen y col., 2000*), mientras que RGS9-2 se localiza en el cerebro, especialmente en el estriado, y es capaz de disminuir las respuestas mediadas por las subunidades $G\alpha_{i/o}$, entre ellas las del receptor opioide μ , probablemente por acelerar la actividad GTPasa de la $G\alpha$ (*Rahman y col., 1999*). La RGS2 pertenece al grupo de las RGS de pequeño tamaño (211 aminoácidos la componen), su distribución es ubicua y participa en multitud de respuestas celulares (*Ingi y col., 1998*). De hecho, los niveles del ARNm de la RGS2 aumentan en respuesta a la activación de diferentes receptores G (*Burchett y col., 1999; Song y col., 1999*) y a un incremento en los niveles de AMPc (*Pepperl y col., 1998*).

En la rata, el ARNm de la RGS9-2 está presente en estriado e hipotálamo, también, aunque en menor cantidad, en otras estructuras cerebrales tales como el neocortex (*Gold y col., 1997; Granneman y col., 1998*). El análisis del nivel de la proteína RGS9-2 en distintas estructuras cerebrales, de los ratones CD-1, la especie animal empleada en nuestro estudio, reveló una mayor abundancia en el estriado con respecto a corteza cerebral o sustancia gris periacueductal, en las cuáles la proteína podría originarse del ARNm detectado en las proyecciones estriatales e hipocampales (*Saper, 1985; Boylan y col., 1986; Hoover y Strick, 1993*).

Las diferencias estructurales y funcionales que muestran la RGS2 y la RGS9-2 en el S.N.C. deben responder a la selectividad de la RGS hacia las subunidades $G\alpha$, y a las cinéticas de su interacción (rápida para RGS2 y lenta para RGS9). RGS6, RGS-7, RGS-9 y RGS-11 contienen un dominio de unión homólogo al presente en la subunidad $G\gamma$, el cuál media su asociación específica con la $G\beta_5$ (*Snow y col., 1998; Hepler, 1999; Makino y col., 1999; Zhang y Simonds, 2000*).

Trabajos previos han descrito que el complejo $G\beta_5$ -RGS9, que se forma en la retina, favorece la activación de la subunidad γ de la fosfodiesterasa del GMPc (PDE γ) por $G\alpha_t$ (Makino y col., 1999). Por el contrario, la RGS2 se une selectivamente a la $G\alpha_q$ en membranas cerebrales, inhibiendo la interacción efectiva con la PLC β 1 (Heximer y col., 1997; Ingi y col., 1998). Recientemente, se ha descrito un mecanismo de regulación de la RGS2 mediante su fosforilación por proteína quinasa C, lo que potencia la activación de la PLC β por la $G\alpha_q$ activa (Cunningham y col., 2001).

Por otro lado, el receptor opioide μ regula la apertura de los canales de K^+ (GIRK), a través de los dímeros $\beta\gamma$ liberados de la $G\alpha$ -GTP. La RGS4, al acelerar la hidrólisis de GTP de la subunidad α , conduce a la asociación del heterotrimeros $G\alpha\beta\gamma$ y reduce la actividad de los agonistas μ y el tiempo de apertura de los GIRK (Doupnik y col., 1997; Chuang y col., 1998). Estos resultados sugieren que RGS4 facilita la taquifilaxia de los receptores μ en este sistema.

El hecho de que los animales *knock-down* de RGS9 no desarrollaran la tolerancia a corto plazo (taquifilaxia) que normalmente acompaña a una dosis aguda de morfina (DE₈₀), sugiere que la RGS9 es particularmente responsable de la aparición de taquifilaxia o tolerancia aguda al desensibilizar la vía de señalización por unión a las $G\alpha$ -GTP activadas por receptores (Garzón y col., 2001). Este mecanismo retrasa su reasociación con dímeros $G\beta\gamma$ y dan lugar a un descenso en heterotrimeros funcionales $G\alpha\beta\gamma$, que se traduce en un mayor número de receptores desacoplados (*receptores silentes*), y en una disminución de la potencia analgésica del opioide. Además, descarta la propuesta de que la fosforilación de las subunidades $G\alpha$, probablemente por proteína quinasa C, y consecuente inactivación (Strassheim y Malbon, 1994), sea la principal responsable de la tolerancia aguda a los opioides. En contraposición, la reducción de la función de otra RGS, en concreto la RGS2, no previene la tolerancia aguda a morfina.

En cuanto a la tolerancia crónica se refiere, esta se desarrolla tras varias horas de iniciar el tratamiento con morfina. En estas condiciones, no se observan los efectos beneficiosos del *knock-down* de RGS9, lo que sugiere que en el transcurso del tiempo,

tras la activación del receptor opioide, hay una disminución progresiva del número de proteínas G reguladas por el receptor (*Garzón y col., 2001*). Así, la cinética de liberación de las subunidades $G\alpha$ -GTP de los dímeros $G\beta\gamma$, es más rápida que la reconstitución del heterotrímero ($G\alpha\beta\gamma$). En este punto, se desarrolla la tolerancia, que es facilitada por otras proteínas RGS alternativas a RGS9, para poder controlar así la intensidad de las señales exógenas que podrían amenazar la supervivencia celular. Durante este tiempo, los receptores son capaces de regular nuevas proteínas G, sin embargo, si los efectos opioides persisten se desarrolla la tolerancia a largo plazo que se debe, sobre todo, al desacoplamiento de los receptores opioides de los sistemas de transducción.

Dada la importancia de la proteína RGS9 en estos procesos, nos interesó profundizar en los mecanismos implicados en la regulación de su función. Se ha sugerido una regulación a nivel transcripcional y postraduccional (*Dohlman y col., 1998; Benzing y col., 1999; Song y col., 1999; Tu y col., 1999*), pero hasta el momento no se conocen los mecanismos que controlan su actividad GAP (de *GTPase-accelerating protein*). Actualmente, se ha confirmado la unión de RGS3 y RGS7 a la 14-3-3 que se une a proteínas con residuos de Ser o Thr fosforilados, y como se ha mencionado anteriormente, esta implicada en la activación de proteínas quinasas, control del ciclo celular, y regulación de la apoptosis (*Torzón y col., 1998; Tzivion y col., 1998; Brunet y col., 1999*). La unión a la 14-3-3 regulada por la fosforilación/defosforilación del dominio RGS de estas proteínas podría regular su función GAP *in vivo* (*Benzing y col., 2000*).

Pero, la regulación de la actividad de las RGS por dominios, distintos al catalítico (dominio RGS) parece ser una regla general de los miembros de esta familia de proteínas (*Zeng y col., 1998; Siderovski y col., 1999; Cowan y col., 2000*). Algunos contienen múltiples dominios, con funciones conocidas, como el dominio PDZ, o desconocidas, como el DEP (de *dishevelled/EGL-10/pleckstrin homology*). El dominio GGL (de *G protein γ -like*) está presente en las proteínas RGS6, RGS7, RGS9 y RGS11, a través del cual se unen a la $G\beta_5$ (*Snow y col., 1999*), una proteína que posee un 50% de identidad con el resto de las subunidades $G\beta_{1-4}$ (*Watson y col., 1994, 1996; Jones y*

col., 1998) y se localiza en S.N.C. Una isoforma de secuencia aminoacídica más larga, conocida como $G\beta_{5L}$, se expresa en retina, y posee un residuo adicional en el extremo amino terminal de 42 aminoácidos (*Watson y col.*, 1996). La expresión de $G\beta_5$ y $G\beta_{5L}$ es mucho menor que la subunidad $G\beta_1$ de la transducina (0,02-0,04% de la proteína total del cerebro y la retina) (*Peng y col.*, 1992). Aunque la interacción de $G\beta_{5L}$ y $G\beta_5$ con ciertas RGS está bien establecida, no se conoce con precisión el efecto regulador sobre la actividad GAP de estas RGS.

De hecho, algunos trabajos han descrito el bloqueo por $G\beta_{5L}$ de la unión de $G\alpha$ a RGS7 (*Levey y col.*, 1999), mientras que otros describen una actividad GAP del complejo RGS- $G\beta_5$ (*Snow y col.*, 1997; *He y col.*, 2000; *Wetherow y col.*, 2000). Hasta la fecha no se han obtenido animales *knock-out* de $G\beta_{5L}$ que evidencien la posible regulación, que esta proteína, ejerza sobre la RGS9. Sin embargo, el análisis llevado a cabo en animales *knock-down* de $G\beta_5$ sobre la analgesia opioide, describen un aumento de la potencia de la morfina, similar al que se observa con la disminución en la síntesis de la RGS9, capaz de revertir la tolerancia aguda a este opioide (*Garzón y col.*, 2001). Además, en animales *knock-out* de RGS9, la $G\beta_{5L}$ no se detecta en la retina, aunque los niveles de ARNm se mantienen similares a los *wild-type*, que expresan el genotipo salvaje (*Chen y col.*, 2000). En estas circunstancias, se sugiere que la pérdida de RGS9 desestabiliza la proteína $G\beta_{5L}$ que debe ser importante para su función,

3.2.- Participación de las proteínas tipo fosducina en la desensibilización del receptor opioide.

Aparte de la regulación que sobre la señalización de los receptores G ejercen las RGS, se ha sugerido la existencia de otro mecanismo que regula la fosforilación de receptores, así como la activación, que sobre algunos efectores, ejercen los dímeros $G\beta\gamma$ y la reconstitución del heterotrímero funcional ($G\alpha\beta\gamma$). Las proteínas que ejercen este control sobre las subunidades $G\beta\gamma$ libres, son las conocidas como fosducina o tipo fosducina (*Phosducin-Like Proteins* o PhLP).

La fosducina (Phd) es una proteína ácida, identificada en la retina, donde se expresa en altos niveles (*Lolley y col., 1977; Lee y col., 1990*), también se localiza en muchos otros tejidos como hígado y epitelio olfatorio (*Lee y col., 1988; Craft y col., 1991; Lolley y col., 1992*). Sin embargo, su presencia en S.N.C. es muy escasa (*Bauer y col., 1992; Danner y Lohse, 1996*). En la retina juega un importante papel en la adaptación a la luz (*Willardson y col., 1996*). En condiciones de luz, la Phd se liga a los dímeros $\beta\gamma$ ($G_t\beta\gamma$) de la transducina, reduciendo la población de heterotrímeros funcionales y con ello la amplificación de la señal a nivel de la proteína G. En oscuridad la Phd es fosforilada en la Ser 73 por la proteína quinasa A (PKA) (*Lee y col., 1990*), lo que reduce la estabilidad del complejo Phd- $G_t\beta\gamma$ (*Yoshida y col., 1994*), permitiendo la reasociación de $G_t\alpha$ con $G_t\beta\gamma$, que aumenta la señal.

La Phd debe prevenir la desensibilización homóloga de los receptores G por la fosforilación de quinasas específicas (GRKs) que requieren para su actuación la unión a dímeros $G\beta\gamma$. Estos últimos, en presencia de fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), se ligan al dominio con homología a pleckstrina del extremo carboxilo terminal de la GRK2 ó -3 (*Pitcher y col., 1995; DebBurman y col., 1996; Schulz y col., 1998*). Esta unión sitúa a la quinasa en la membrana donde interacciona con su sustrato, los receptores ocupados por los agonistas. Las distintas combinaciones de $G\beta\gamma$ muestran diferente afinidad por GRK2 ó -3, que puede ser la clave de la especificidad en las interacciones GRK-receptor (*Daaka y col., 1997*).

Posteriormente, Miles y colaboradores (1993) identificaron unas proteínas homólogas a la Phd, las proteínas tipo fosducina larga y corta ($PhLP_{long}$, $PhLP_{short}$), que son lecturas alternativas del mismo gen, con una distribución tisular amplia, que incluye el sistema nervioso central y la glándula pineal (*Schröder y Lohse, 1996; Abe y col., 1998; Craft y col., 1998; Thibault y col., 1999*). Nuestra investigación se centró en la isoforma larga ($PhLP_L$), que a diferencia de la $PhLP_s$, contiene el dominio de unión a $\beta\gamma$ y el dominio de fosforilación por proteína quinasa A (*Lee y col., 1990; Miles y col., 1993; Craft y col., 1998*), dentro del cual se ha descrito que probablemente la Ser 110, es fosforilada y de-fosforilada a favor de su unión y disociación a los dímeros $G\beta\gamma$.

En el complejo Phd/PhLP_L-Gβγ el residuo fosforilable es accesible a la proteína quinasa A (PKA) (*Wilkins y col., 1996; Craft y col., 1998*). La cinética de fosforilación de PhLP_L por esta enzima es más lenta que para Phd (*Thulin y col., 1999*), la cuál se liga a G_tβγ con una afinidad 2,5 veces mayor que PhLP_L (*Savage y col., 2000*). Estas diferencias indican que la señalización de los receptores G, regulada por PhLP_L en el S.N.C., obedece a unas necesidades distintas a la regulación por Phd del sistema de rodopsina/transducina en la retina. La fosforilación por PKA disminuye la afinidad de Phd/PhLP_L por Gβγ, pero no necesariamente disocia al complejo Phd/PhLP_L-Gβγ (*Gaudet y col., 1999; Savage y col., 2000*) y facilita que el dímero Gβγ se ancle de nuevo a la membrana.

En este sentido, la activación de PKA en células que sobre-expresan Phd, disminuye drásticamente la capacidad de la Phd para inhibir las señales reguladas por las proteínas G (*Hawes y col., 1994*). Sin embargo, la fosforilación de Phd por la PKA, disminuye débilmente la afinidad de la unión a G_tβγ (*Chen y Lee, 1997; Savage y col., 2000*), y parcialmente su capacidad para inhibir las interacciones de G_tβγ y Gα_t (*Gaudet y col., 1999*). El análisis de la estructura cristalográfica del complejo Phd-G_tβγ, determina que la fosforilación de la Ser73 de la Phd (*Lee y col., 1990*) produce una pérdida del 15% de la superficie de contacto entre Phd y G_tβγ, que coincide con el sitio al que se une la Gα_t. Así, la fosforilación de Phd facilita el acceso de la Gα_t a la G_tβγ, por lo que este mecanismo no explica la gran inhibición de la actividad de la Phd, que se observa en células que la expresan, cuando se activa la PKA por 8-Br AMPc (*Hawes y col., 1994*). Una posible explicación a estos resultados, sugiere que otras quinasas celulares también participan en la inactivación de la Phd.

En efecto, el análisis de la secuencia de la Phd revela una secuencia consenso de fosforilación, entre los residuos 51-54, por la quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina tipo II (CaMKII) (*Lee y col., 1990*). Esta proteína se encuentra en varios tejidos, y es abundante en células neurales donde participa en muchos procesos celulares (*Colbran y Soderling, 1990; Soderling, 1996*). Uno de los ARNm más abundantes en las dendritas codifica a la subunidad α de la CaMKII, y su síntesis es estimulada por señales reguladas por diferentes vías, entre las que se encuentra la vía de las quinasas activadas

por mitógenos (MAPK/ERK) (*Soderling, 2000*). La acción de la CaMKII sobre la Phd aumenta en 100 veces la inhibición de la interacción de la Phd con el dímero $G\beta\gamma$. Se ha descrito que la PKA fosforila la Ser73, mientras que la CaMKII, además de fosforilar la Ser73, actúa sobre la Ser6, 36, 54 y 106. Así, la inhibición de la interacción entre Phd y $G\beta\gamma$ es mucho mayor en el caso de fosforilación por CaMKII, siendo la principal responsable de la regulación de la actividad de la Phd, que requiere de las señales de ambas quinasas para su máxima fosforilación (*Thulin y col., 2001*).

De forma similar, la presencia de las Ser92 y 110 en la PhLP_L, susceptibles de fosforilarse por CaMKII (*Thulin y col., 2001*), amplía la idea de regulación de esta proteína. Además, se han descrito en la Phd y PhLP_L las secuencias consenso para la fosforilación por proteína quinasa C y caseína quinasa II, y sitios potenciales de N-glicosilación, Phd Asn152 (*Lee y col., 1990*) con el correspondiente Asn189 en PhLP_L. La N-glicosilación de PhLP_L fue demostrada en el presente trabajo. Sin embargo, no hay trabajos que describan esta modificación en la Phd. Sitios potenciales de miristoilación se encuentran también en Phd, Gly195 y 215, y PhLP_L, Gly222 y 242 (*Lee y col., 1990; Craft y col., 1998*).

Por ser el lugar de unión a $G\beta\gamma$, el dominio N-terminal de Phd/PhLP_L ejerce un importante papel en la regulación de las proteínas G y la funcionalidad del receptor. Además, cubre la superficie de los dímeros $G\beta\gamma$ que interacciona con las subunidades $G\alpha$ y con varios efectores, por ejemplo la enzima adenilato ciclasa tipo VII implicada en las acciones crónicas y agudas de la morfina (*Yoshimura y col., 2000*), impidiendo su asociación. De esta manera, el bloqueo de la PhLP_L sobre $G\beta\gamma$ también sirve para modular los efectos de los receptores acoplados a proteínas G, incluidos los opioides (*Schulz y col., 1999*).

Por su parte, el dominio C-terminal de Phd/PhLP_L se liga a la superficie de $G\beta\gamma$ implicada en la unión a la membrana y promueve su liberación (*Loew y col., 1998; Gaudet y col., 1999; Savage y col., 2000*). En este sentido, la contribución de la fosforilación de la Phd por la PKA y CaMKII, ha sido analizada en detalle. Así, entre las distintas Ser susceptibles de fosforilarse por estas enzimas, se sabe que es la Ser106,

fosforilada por CaMKII, la que afecta a la inhibición de la interacción con la $G_t\beta\gamma$ y promueve su disociación. Próximos a la Ser106 están Leu105, His102 y Met101 de la hélice 3, todos ellos interaccionan con Trp332 de $G_t\beta$ (Gaudet y col., 1996). El Trp332 es uno de los residuos que produce un cambio conformacional en la unión a la Phd, que ha sido propuesto por crear una cavidad en la que se alojaría el grupo farnesilo de la subunidad $G_t\gamma$ (Loew y col., 1998), bloqueando la unión de $G_t\beta\gamma$ a la membrana (Savage y col., 2000). Así, la fosforilación de la Ser106 de la Phd bloquea la interacción de Leu105, His102 y Met101 con el Trp332 de $G_t\beta\gamma$, inhibiendo el cambio conformacional, y con ello, la unión de $G_t\beta\gamma$ a la Phd y la disociación de $G_t\beta\gamma$ de la membrana.

Sin embargo, los resultados del presente trabajo indican que la PhLP_L, ella misma o en asociación con $G\beta\gamma$, permanece en el entorno de la membrana celular. Probablemente, la N-glicosilación de la PhLP_L contribuye al anclaje estable de esta proteína ácida a la membrana plasmática sináptica, así la activación aguda o crónica del receptor opioide μ no produjo alteraciones en su localización subcelular.

Aunque su interacción con la 14-3-3 también ha sido propuesta como mecanismo que controla la localización de la Phd en la célula, no está claro su papel fisiológico. Se sabe que su fosforilación por CaMKII, regula la interacción de la Phd con $G_t\beta\gamma$, al inhibir drásticamente esta unión, e inicia una interacción con la 14-3-3, que bloquea completamente la unión de la Phd fosforilada al dímero $G_t\beta\gamma$ (Nakano y col., 2000; Thulin y col., 2001).

Otro papel asignado a la 14-3-3 es la protección de la Phd fosforilada frente a la degradación. La estructura del dominio N-terminal de la Phd cuando está ligada a $G_t\beta\gamma$ indica que no es una estructura estable (Gaudet y col., 1999). Además, la acción de varias fosfatasa desestabilizaría aún más la estructura de la Phd, posiblemente haciendo de ésta una diana de las proteasas celulares. Su unión a la 14-3-3 estabilizaría el dominio N-terminal y la protegería de la degradación que ocurre como resultado de la fosforilación (Zhu y Craft, 1998). Sin embargo, como ya se ha mencionado, entre estas y otras propuestas el papel fisiológico preciso de la interacción de la Phd con la 14-3-3 falta por determinar.

La homología de la PhLP_L con la Phd plantea un mecanismo de regulación similar. Los resultados obtenidos en nuestro estudio han permitido afirmar esta propuesta, de manera que en una primera aproximación confirmamos mediante estudios de co-inmunoprecipitación, con el anticuerpo anti-Phd/PhLP_L generado en nuestro laboratorio, tanto su interacción con la Gβ_{1/2} como con la 14-3-3, en astrocitos obtenidos a partir del cerebro de rata. La estimulación receptorial con un agonista de los receptores opioides δ (DPDPE), que se sabe están presentes en este tipo de células (ver por ej., *Stiene-Martin y col., 2001*), aumenta la señal inmunorreactiva de la 14-3-3, en el material inmunoprecipitado, y disminuye la Gβ_{1/2} con respecto a la situación basal (en ausencia de agonista). Estos resultados se traducen en una mayor unión a la 14-3-3 en estas condiciones, lo que plantea un mecanismo de regulación de la actividad de la PhLP_L similar al descrito para la Phd en el sistema visual, y en el que participa la proteína 14-3-3 (*Nakano y col., 2001*).

Por otro lado, considerando que la región de Gβγ cubierta por el dominio donde se encuentran los residuos fosforilables de Phd/PhLP_L por PKA es parte de la superficie que interacciona con Gα, es lógico asumir que cuando Phd/PhLP_L se fosforilan, y se debilita su interacción con Gβγ, la Gα compite con la Phd/PhLP_L por su unión al dímero y la desplaza (*Wilkins y col., 1996*). Así, se regenera la población de proteínas G heterotriméricas disponibles para la activación del receptor, por lo que aumenta la potencia de los agonistas (*Gaudet y col., 1999*). Sin embargo, el acceso de las quinasas específicas de los receptores G (GRK) a los dímeros Gβγ es todavía un impedimento.

En este sentido, la disminución experimental de PhLP_L, con un ODN específico, redujo la eficacia en la analgesia de varios agonistas de receptores G, como el receptor opioide μ (morfina y DAMGO), el receptor opioide δ (DPDPE y [D-Ala²] deltorfina II), y el α₂-adrenérgico (clonidina). Los animales *knock-down* de PhLP_L también desarrollan una tolerancia aguda que no revierte con la administración de subunidades Gα exógenas, lo que puede deberse a que en estas circunstancias los receptores no son capaces de regular las proteínas G triméricas nuevamente asociadas. Además, en los ratones tolerantes a morfina, la disminución de la función de PhLP_L no alteró la incidencia de la dependencia física. Sin embargo, en ratones post-dependientes, el

retardo en el restablecimiento de la eficacia de la morfina, asigna un papel a PhLP_L en la recuperación de la función del receptor opioide. El efecto del *knock-down* de PhLP_L desapareció con el cese del tratamiento con el ODN, en este punto, los ratones recuperaron la respuesta antinoceptiva normal de los agonistas a los 3-4 días.

Como hemos comentado anteriormente, el tratamiento con morfina, particularmente el crónico, promueve la disminución de las proteínas G triméricas regulables por el receptor opioide, y el incremento de dímeros Gβγ libres. Durante el tratamiento crónico con morfina, el bloqueo de la unión de la Phd a Gβγ, inducido por su fosforilación por la CaMKII, podría justificar la fosforilación de los receptores opioides por las GRKs. Se ha comprobado que mutaciones de la Phd que mimetizan la forma fosforilada de la proteína, aumentan la traslocación de GRK3 a la membrana plasmática (Boekhoff y col., 1997). Además, facilitan la unión de regiones específicas de Gβ a las GRKs (Koch y col., 1993), que específicamente fosforilan residuos de receptores silentes ocupados por el agonista (Pitcher y col., 1998), y los convierte en receptores desacoplados incapaces de regular proteínas G (Kovoor y col., 1997; Zhang y col., 1998), impidiendo la protección que sobre el dímero Gβγ proporciona la PhLP_L (Lohse y col., 1996). Así, en tratamientos crónicos, la presencia continuada del agonista facilita la acción de las GRKs sobre los receptores.

La fosforilación del dominio C-terminal de Phd/PhLP_L por GRK2, que disminuye la capacidad de estas proteínas para ligarse a los dímeros Gβγ (Ruiz-Gomez y col., 2000) también podría ser un mecanismo que elimine la protección de los GPCRs a la fosforilación por GRK. En estas circunstancias, predomina la fosforilación de los receptores opioides μ, frente a los procesos de resensibilización y reciclamiento, los cuales se muestran insuficientes para prevenir la desensibilización inducida por los agonistas. Además, los agonistas con una elevada capacidad para activar los receptores acoplados a proteínas G, promueven una reducción de las proteínas G heterotriméricas, y por consiguiente un aumento en el número de Gβγ libres. Si estos agonistas muestran también una alta afinidad de unión por los receptores, la probabilidad de que las GRKs actúen sobre estos receptores, cuando se encuentran unidos a estos agonistas, se incrementa. Estas propuestas explican las diferentes potencias que muestran los

agonistas opioides para producir la desensibilización e internalización de los receptores. Así, dependiendo de las propiedades de los agonistas, los receptores que no señalizan, deben ser principalmente receptores silentes o desacoplados.

Una de las respuestas de la activación de los GPCRs es la estimulación de la proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). La activación de esta vía por los receptores opioides no necesariamente requiere la internalización de los receptores sobre los que actúan los agonistas. En este sentido, opioides como la morfina, que no inducen la internalización del receptor, son capaces de estimular la MAPK (*Schmidt y col., 2000*). Sin embargo, la inhibición de los caminos de la MAPK bloquea la desensibilización de los agonistas opioides, indicando que esta vía regula la fosforilación y el desacoplamiento del receptor por un mecanismo de retroalimentación negativa (*Polakiewicz y col., 1998*).

4.- Importancia de las proteínas G y sus reguladores en la respuesta fisiológica del receptor opioide.

Los receptores opioides, al igual que el resto de los miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), presentan complejos mecanismos de regulación de su función, que modulan la eficacia de la transducción de la señal y protegen a la célula frente a una estimulación excesiva o prolongada.

Estos mecanismos son la base de los procesos de desensibilización o tolerancia, de los que se diferencian los procesos a largo plazo (estimulaciones prolongadas con agonista –tolerancia a largo plazo) y los procesos a corto plazo (estimulaciones breves -taquifilaxia). Los primeros se caracterizan por una disminución en el número total de receptores funcionales de la célula a lo largo de varias horas, lo que parece requerir la síntesis de nuevas moléculas de receptor para la recuperación del sistema (*Hermans y col., 1997; Trejo y Coughlin, 1998; Oakley y col., 1999; Anborgh y col., 2000*). Este proceso requiere la fosforilación de dominios intracelulares de los receptores por proteína quinasas, lo que aumenta notablemente la velocidad de internalización y, posiblemente también, la degradación de dichos receptores en un proceso mediado por vesículas de clatrina (*Bouvier y col., 1988; Hausdorff y col., 1989; Lohse y col., 1990*).

Por el contrario, la desensibilización a corto plazo (taquifilaxia), se caracteriza por una rápida atenuación de la respuesta y una recuperación, más o menos rápida, tras la desaparición del estímulo. En este proceso parecen influir mecanismos postreceptor, como proteínas G y proteínas reguladoras de la función de las proteínas G, entre las que se encuentran las proteínas RGS (*Regulators of G-protein Signaling*) y las proteínas tipo fosducina (PhLP de *Phosducin-Like Proteins*) las cuales limitan la duración e intensidad de la señal inducida por la proteína G.

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral, ha sido profundizar en el conocimiento de los mecanismos, que operan a nivel de la proteína G y sus reguladores, y son responsables de los fenómenos de taquifilaxia y tolerancia/dependencia. Para ello, el posible papel y relevancia fisiológica de RGS y PhLP en estos procesos ha sido estudiado sobre la función del receptor opioide. Es importante considerar que los estudios de reconstitución en sistemas *in vitro* con diferentes clases de proteínas G y RGS, han permitido conocer cuáles son susceptibles de regulación por estas RGS (*Berman y Gilman, 1998*), sin embargo, esta información no es directamente extrapolable a la modulación de la función del receptor existente *in vivo*. En este trabajo y con el uso de ODNs antisentido dirigidos a bloquear la síntesis de diferentes RGS, aportamos las primeras evidencias *in vivo* que implican la participación de ciertas RGS en el desarrollo de taquifilaxia y tolerancia a largo plazo. Para ello hemos evaluado su participación en un efecto comportamental (la analgesia) mediado por un receptor G, el receptor opioide, en el ratón.

En este sentido, sabemos que las proteínas RGS al unirse a las subunidades α activadas por el agonista-receptor ($G\alpha$ -GTP), inhiben la interacción efectiva entre estas y los correspondientes sistemas efectoros, y que por ello, ciertas RGS han sido propuestas como reguladores negativos en la señalización de los receptores acoplados a las proteínas G (*Hepler, 1999*). El hecho de que los animales en los que se han reducido los niveles celulares de RGS9, no presenten taquifilaxia después de la administración de una dosis aguda de morfina (DE_{80}), la hace particularmente responsable de la aparición de taquifilaxia o tolerancia aguda (*Garzón y col., 2001*), y sugiere que la RGS9 desensibiliza la vía de señalización secuestrando $G\alpha$ -GTP activada por receptor, lo que

retrasa su reasociación con dímeros $G\beta\gamma$ y dan lugar a un descenso en heterodímeros funcionales $G\alpha\beta\gamma$.

De forma similar, hemos analizado la participación de las proteínas tipo fosducina (PhLP), que al igual que la fosducina, ejercen un control sobre las subunidades $G\beta\gamma$ que se liberan tras la disociación de las $G\alpha$ -GTP activadas por agonista-receptor. Su unión a las $G\beta\gamma$ libres proporciona una cierta protección frente a enzimas con actividad quinasa, las GRK, que actúan uniéndose a estos dímeros y desde aquí inactivan, selectivamente, por fosforilación a los receptores ocupados por los agonistas. La reducción experimental de la PhLP con la administración intracerebroventricular a ratones de oligodeoxinucleótidos antisentido (ODN) frente a su correspondiente ARNm, también conduce a pérdidas de potencia analgésica opiácea. Como ya hemos comentado, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado la captación por células neurales de subunidades $G\alpha$ recombinantes inyectadas en el líquido cefalorraquídeo de roedores (*Garzón y col., 1999*). Sin embargo, en ausencia de deterioro de la transducción las $G\alpha$ exógenas no amplifican las señales originadas por agonistas, tampoco en situaciones en las que las pérdidas de efectos agonistas se deben a una reducción experimental del número de receptores. Sin embargo, sí lo hacen en situaciones en las que se han dañado las proteínas G endógenas, por ejemplo, acción de toxina pertúsica (PTX) o reducción de la síntesis de $G\alpha$ con ODNs frente a sus ARNm. También, se ha demostrado que en situaciones en las que la acción de una dosis de morfina acarrea pérdidas en la potencia de dosis sucesivas (taquifilaxia), las $G\alpha$ exógenas son capaces de prevenir e incluso revertir la aparición de taquifilaxia (*Garzón y Sánchez-Blázquez, 2001*).

Por consiguiente, la administración de $G\alpha$ constituye una herramienta que sirve para discriminar disfunciones causadas por alteraciones en la transducción, de aquellas debidas a perturbaciones a nivel del receptor de membrana. Así, es lógico asumir, que debido a que la administración de $G\alpha$ a ratones en los que se ha disminuido la síntesis de PhLP con ODNs, no restaura los efectos de los opioides, los receptores en ausencia de PhLP son diana de las GRK y pasan a ser desacoplados de la transducción.

Por tanto, los estudios que hemos realizado revelan la importancia del sistema de transducción en la calidad de la analgesia inducida por los opioides. A la vista de los resultados obtenidos, el principal hallazgo de este trabajo indica que los mecanismos responsables de la taquifilaxia o tolerancia aguda se localizan en la membrana celular y más concretamente a nivel de las proteínas G y sus reguladores. La depresión experimental de ciertos reguladores positivos, como la PhLP, o negativos, como la RGS9, puede constituir una vía de actuación para optimizar y controlar de forma efectiva los efectos agonistas, en este caso la producción de analgesia opiácea.

Conclusiones

- 1.- La administración crónica de morfina produce cambios diferenciales sobre los niveles de las PKCs en la fracción citosólica de la corteza cerebral del ratón. Los niveles de PKC α aumentan en animales tolerantes, por el contrario PKC γ , PKC β I, PKC β II y PKC ϵ disminuyen. En ratones abstinentes, estos cambios persisten para PKC α , PKC γ y PKC ϵ , sin embargo, los niveles de las isoformas de PKC β revierten a valores control. Esta regulación se acompaña de un aumento en la fracción de membrana de la proteína de anclaje de las PKCs activas, RACK-1, sugiriendo la traslocación a la membrana celular del complejo PKC-RACK1.
- 2.- Este estudio demuestra la selectividad y eficacia de la administración subcrónica de ODNs *in vivo* para reducir la expresión de las proteínas diana. Esta aproximación permite analizar el papel funcional de los distintos componentes de la cascada de señalización. Así, la reducción de RGS2 y RGS3 disminuye la analgesia opioide. Por el contrario, animales *knock-down* para RGS4, RGS7, RGS9, RGS12, RGS14 o RGS16 presentan un aumento en esta respuesta.
- 3.- El desarrollo de tolerancia aguda (taquifilaxia) a la morfina no se modifica al reducir los niveles de la RGS2, sin embargo, en los ratones *knock-down* de RGS9 se previene la aparición de la taquifilaxia. Esto indica que diferentes subtipos de RGS ejercen una modulación diferencial sobre las subunidades G α . Así RGS2 acelera la formación de heterotrímeros funcionales al aumentar la actividad GTPasa de G α , por el contrario, el secuestro de G α -GTP por la RGS9, retrasa la asociación con el dímero G $\beta\gamma$. En estos animales, la potenciación del efecto analgésico desaparece tras varias horas de tratamiento con el opioide, sugiriendo que, a fin de aminorar el impacto de la presencia continuada de morfina sobre el receptor, otras proteínas RGS sustituyen la función reguladora de RGS9.
- 4.- Este estudio aporta la primera evidencia de la presencia de PhLP_L glicosilada en la fracción sinaptosomal de diferentes áreas del cerebro de ratón. Asimismo, se demuestra la interacción de la PhLP_L con la proteína adaptadora 14-3-3, que puede

contribuir a su ciclo de regulación y al control de la localización celular. La activación del receptor opioide μ no altera su localización subcelular, sugierendo que tanto la N-glicosilación como la unión a 14-3-3 contribuyen a su anclaje a la membrana.

5.- La disminución en los niveles de PhLP_L atenúa la función de diferentes receptores G. Los animales *knock-down* de PhLP_L presentan un desarrollo de tolerancia a la morfina crónica más rápido e intenso que el observado en los grupos control. Además, la tolerancia aguda no revierte con la administración de subunidades G α -miristoiladas. Estos datos sugieren un papel protector para la PhLP_L frente a la acción de GRKs, que fosforilan residuos intracelulares de los receptores G, provocando su inactivación.

6- En conjunto, nuestros resultados indican que los mecanismos responsables de la taquifilaxia se localizan en la membrana celular, a nivel de proteínas G y su regulación. Así, la modulación del tono funcional de las proteínas G por RGS y PhLP, ayudan a controlar la intensidad de señales externas que pudiesen comprometer la supervivencia celular. En concreto, la acción de reguladores del tipo RGS9 es beneficiosa ya que en este estado, los receptores no señalizan pero son potencialmente capaces de hacerlo. El retorno de G α -GDP desde las RGS y efectores libera a las G $\beta\gamma$ de su unión a PhLP_L y reconstituye las proteínas G funcionales para seguir transmitiendo las señales de los complejos agonista-receptor hacia el interior celular.

Bibliografía

- Abe T, Kikuchi T, Chang T, Shinohara T. *The sequence of the mouse phosducin-encoding gene and its 5'-flanking region*. Gene. 1993;133(2):179-86.
- Abe T, Tomita H, Tamai M. *Gene expression of the phosducin-like protein in the retina*. Ophthalmic Res. 1998;30(2):74-83.
- Acs P, Szallasi Z, Kazanietz MG, Blumberg PM. *Differential activation of PKC isozymes by 14-3-3 zeta protein*. Biochem Biophys Res Commun. 1995;216(1):103-9.
- Adams JU, Holtzman SG. *Tolerance and dependence after continuous morphine infusion from osmotic pumps measured by operant responding in rats*. Psychopharmacology (Berl). 1990;100(4):451-8.
- Afify EA, Law PY, Riedl M, Elde R, Loh HH. *Role of carboxyl terminus of mu- and delta-opioid receptor in agonist-induced down-regulation*. Brain Res Mol Brain Res. 1998;54(1):24-34.
- Ahmed SN, Brown DA, London E. *On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes*. Biochemistry. 1997;36(36):10944-53.
- Aikten A, Collinge DB, van Heusden BP, Isobe T, Roseboom PH, Rosenfeld G, Soll J. *14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins*. Trends Biochem Sci. 1992;17(12):498-501.
- Aitken A, Jones D, Soneji Y, Howell S. *14-3-3 proteins: biological function and domain structure*. Biochem Soc Trans. 1995;23(3):605-11.
- Allen RM, Dykstra L A *Attenuation of mu-opioid tolerance and cross-tolerance by the competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist LY235959 is related to tolerance and cross-tolerance magnitude*. J Pharmacol Exp Ther. 2000;295(3):1012-21.
- Allouche S, Polastron J, Jauzac P. *The delta-opioid receptor regulates activity of ryanodine receptors in the human neuroblastoma cell line SK-N-BE*. J Neurochem. 1996;67(6):2461-70.
- Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB, Ferguson SS. *Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors*. Mol Endocrinol. 2000;14(12):2040-53.
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairret S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M. *Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(7):3684-9.
- Appleyard SM, Patterson TA, Jin W, Chavkin C. *Agonist-induced phosphorylation of the kappa-opioid receptor*. J Neurochem. 1997;69(6):2405-12.

Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lamah J, Sadee W. *Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells.* J Neurochem. 1995;65(4):1636-45.

Arshavsky VY, Bownds MD. *Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP.* Nature. 1992;357(6377):416-7.

Attwood TK. *A compendium of specific motifs for diagnosing GPCR subtypes.* Trends Pharmacol Sci. 2001;22(4):162-5.

Baraban SC, Lothman EW, Lee A, Guyenet PG. *Kappa opioid receptor-mediated suppression of voltage-activated potassium current in a catecholaminergic neuronal cell line.* J Pharmacol Exp Ther. 1995;273(2):927-33.

Barchfeld CC, Medzihradsky F. *Receptor-mediated stimulation of brain GTPase by opiates in normal and dependent rats.* Biochem Biophys Res Commun. 1984;121(2):641-8.

Bare LA, Mansson E, Yang D. *Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain.* FEBS Lett. 1994;354(2):213-6.

Basheer R, Tempel A. *Morphine-induced reciprocal alterations in G alpha s and opioid peptide mRNA levels in discrete brain regions.* J Neurosci Res. 1993;36(5):551-7.

Bauer PH, Muller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJ, Lohse MJ. *Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator.* Nature. 1992;358(6381):73-6.

Baumhaker Y, Gafni M, Keren O, Sarne Y. *Selective and interactive down-regulation of mu- and delta-opioid receptors in human neuroblastoma SK-N-SH cells.* Mol Pharmacol. 1993;44(2):461-7.

Behrens MM, Strasser U, Koh JY, Gwag BJ, Choi DW. *Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase.* Neuroscience. 1999;94(3):917-27.

Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, Avidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, Young EC, Barg J, Coscia CJ. *Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits.* J Neurochem. 1998;70(2):635-45.

Benzing T, Yaffe MB, Amould T, Sellin L, Schermer B, Schilling B, Schreiber R, Kunzelmann K, Leparac GG, Kim E, Walz G. *14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity.* J Biol Chem. 2000;275(36):28167-72.

Berman DM, Wilkie TM, Gilman AG. *GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits.* Cell. 1996;86(3):445-52.

- Berridge MJ. *Inositol trisphosphate as a second messenger in signal transduction*. Ann N Y Acad Sci. 1987;494:39-51.
- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. *Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator*. Cell. 1992;70(3):411-8.
- Bian JS, Zhang WM, Xia Q, Wong TM. *Phospholipase C inhibitors attenuate arrhythmias induced by kappa-receptor stimulation in the isolated rat heart*. J Mol Cell Cardiol. 1998;30(10):2103-10.
- Bigay J, Faurobert E, Franco M, Chabre M. *Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding*. Biochemistry. 1994;33(47):14081-90.
- Bilsky EJ, Bernstein RN, Wang Z, Sadee W, Porreca F. *Effects of naloxone and D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂ and the protein kinase inhibitors H7 and H8 on acute morphine dependence and antinociceptive tolerance in mice*. J Pharmacol Exp Ther. 1996;277(1):484-90.
- Bilsky EJ, Inturrisi CE, Sadee W, Hruby VJ, Porreca F. *Competitive and non-competitive NMDA antagonists block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice*. Pain. 1996;68(2-3):229-37.
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. *Receptor-effector coupling by G proteins*. Biochim Biophys Acta. 1990;1031(2):163-224.
- Birnbaumer L. *Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: the first 20 years or so* FASEB J. 1990;4(14):3178-88.
- Blasig J, Herz A, Reinhold K, Zieglgansberger S. *Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats*. Psychopharmacologia. 1973;33(1):19-38.
- Bluml K, Schnepf W, Schroder S, Beyermann M, Macias M, Oschkinat H, Lohse MJ. *A small region in phosducin inhibits G-protein betagamma-subunit function*. EMBO J. 1997;16(16):4908-15.
- Boekhoff I, Touhara K, Danner S, Inglese J, Lohse MJ, Breer H, Lefkowitz RJ. *Phosducin, potential role in modulation of olfactory signaling*. J Biol Chem. 1997;272(7):4606-12.
- Bohn LM, Belcheva MM, Coscia CJ. *Mitogenic signaling via endogenous kappa-opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase signaling cascade*. J Neurochem. 2000;74(2):564-73.
- Bouillot C, Prochiantz A, Rougon G, Allinquant B. *Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties*. J Biol Chem. 1996;271(13):7640-4.

- Bourinet E, Soong TW, Stea A, Snutch TP. *Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(4):1486-91.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization*. Nature. 1988;333(6171):370-3.
- Boylan MK, Fisher RS, Hull CD, Buchwald NA, Levine MS. *Axonal branching of basal forebrain projections to the neocortex: a double-labeling study in the cat*. Brain Res. 1986;375(1):176-81.
- Brown DA, London E. *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. J Biol Chem. 2000;275(23):17221-4.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell. 1999;96(6):857-68.
- Bunemann M, Hosey MM. *Regulators of G protein signaling (RGS) proteins constitutively activate Gbeta gamma-gated potassium channels*. J Biol Chem. 1998;273(47):31186-90.
- Burbelo PD, Hall A. *14-3-3 proteins. Hot numbers in signal transduction*. Curr Biol. 1995;5(2):95-6.
- Burchett SA, Bannon MJ, Granneman JG. *RGS mRNA expression in rat striatum: modulation by dopamine receptors and effects of repeated amphetamine administration*. J Neurochem. 1999;72(4):1529-33.
- Burt AR, Carr IC, Mullaney I, Anderson NG, Milligan G. *Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation*. Biochem J. 1996;320:227-35.
- Cai YC, Ma L, Fan GH, Zhao J, Jiang LZ, Pei G. *Activation of N-methyl-D-aspartate receptor attenuates acute responsiveness of delta-opioid receptors*. Mol Pharmacol. 1997;51(4):583-7.
- Cambier JC, Newell MK, Justement LB, McGuire JC, Leach KL, Chen ZZ. *Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes*. Nature. 1987;327(6123):629-32.
- Cameron PL, Ruffin JW, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS. *Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain*. J Neurosci. 1997;17(24):9520-35.
- Camps M, Carozzi A, Schabel P, Scheer A, Parker PJ, Gierschik P. *Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits*. Nature. 1992;360(6405):684-6.

- Carter BD, Medzihradsky F. *Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(9):4062-6.
- Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar R. *Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi proteins*. J Biol Chem. 1990;265(11):6268-73.
- Casey PJ, Fong HK, Simon MI, Gilman AG. *Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties*. J Biol Chem. 1990;265(4):2383-90.
- Casey PJ. *Lipid modifications of G proteins*. Curr Opin Cell Biol. 1994;6(2):219-25.
- Cassel D, Selinger Z. *Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes*. Biochim Biophys Acta. 1976;452(2):538-51.
- Cemerikic B, Zamah R, Ahmed MS. *Identification of L-type calcium channels associated with kappa opioid receptors in human placenta*. J Mol Neurosci. 1998;10(3):261-72.
- Cha XY, Xu H, Ni O, Partilla JS, Rice KC, Matecka D, Calderon SN, Porreca F, Lai J, Rothman RB. *Opioid peptide receptor studies. 4. Antisense oligodeoxynucleotide to the delta opioid receptor delineates opioid receptor subtypes*. Regul Pept. 1995;59(2):247-53.
- Chakrabarti S, Law PY, Loh HH. *Distinct differences between morphine- and [D-Ala2,N-MePhe4,Gly-ol5]-enkephalin-mu-opioid receptor complexes demonstrated by cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation*. J Neurochem. 1998;71(1):231-9.
- Chakrabarti S, Law PY, Loh HH. *Neuroblastoma Neuro2A cells stably expressing a cloned mu-opioid receptor: a specific cellular model to study acute and chronic effects of morphine*. Brain Res Mol Brain Res. 1995;30(2):269-78.
- Chan JS, Chiu TT, Wong YH. *Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins*. J Neurochem. 1995;65(6):2682-9.
- Chang JK, Chang KJ. *The role of amino-terminal sequence of beta-endorphin and dynorphin in the determination of opiate receptor selectivity*. Life Sci. 1983;33(1):267-70.
- Chang JK, Cuatrecasas P. *Characterization of novel opiate binding sites selective for benzomorphan drugs*. In "Advances in Endogenous and Exogenous Opioids" (Takagi H, Simon EJ, eds) Elsevier 1981: 5-8.
- Chang KJ, Eckel RW, Blanchard SG. *Opioid peptides induce reduction of enkephalin receptors in cultured neuroblastoma cells*. Nature. 1982;296(5856):446-8.
- Chang KJ, Hazum E, Cuatrecasas P. *Novel opiate binding sites selective for benzomorphan drugs*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981;78:4141-45.

Chang WJ, Ying YS, Rothberg KG, Hooper NM, Turner AJ, Gambliel HA, De Gunzburg J, Mumby SM, Gilman AG, Anderson RG. *Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae*. J Cell Biol. 1994;126(1):127-38.

Chatterjee TK and Fisher RA (1998).

Chen C, Lin SC. *The core domain of RGS16 retains G-protein binding and GAP activity in vitro, but is not functional in vivo*. FEBS Lett. 1998;422(3):359-62.

Chen CK, Burns ME, He W, Wensel TG, Baylor DA, Simon MI. *Slowed recovery of rod photoresponse in mice lacking the GTPase accelerating protein RGS9-1*. Nature. 2000;403(6769):557-60.

Chen X, Marrero HG, Murphy R, Lin YJ, Freedman JE. *Altered gating of opiate receptor-modulated K⁺ channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(26):14692-6.

Chen XH, Geller EB, de Riel JK, Liu-Chen LY, Adler MW. *Antisense oligodeoxynucleotides against mu- or kappa-opioid receptors block agonist-induced body temperature changes in rats*. Brain Res. 1995;688(1-2):237-41.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L. *Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors*. Biochem J. 1993;295(3):625-8.

Chen Y, Yu L. *Differential regulation by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C of the mu opioid receptor coupling to a G protein-activated K⁺ channel*. J Biol Chem. 1994;269(11):7839-42.

Cheng ZJ, Yu QM, Wu YL, Ma L, Pei G. *Selective interference of beta-arrestin 1 with kappa and delta but not mu opioid receptor/G protein coupling*. J Biol Chem. 1998;273(38):24328-33.

Chiasson BJ, Armstrong JN, Hooper ML, Murphy PR, Robertson HA. *The application of antisense oligonucleotide technology to the brain: some pitfalls*. Cell Mol Neurobiol. 1994;14(5):507-21.

Childers SR. *Opioid receptor-coupled second messenger systems*. Life Sci. 1991;48(21):1991-2003.

Christie MJ, Chesher GB, Bird KD. *No evidence for a protracted change in endogenous opioid activity following chronic opiate treatment in mice: parallel recovery of cross tolerance to stress and morphine antinociception*. Psychopharmacology (Berl). 1984;82(4):379-81.

Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M. *Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist*. J Biol Chem. 1997;272(43):27124-30.

- Chuang LF, Killam KF Jr, Chuang RY. *Induction and activation of mitogen-activated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate.* J Biol Chem. 1997;272(43):26815-7.
- Clapham DE, Neer EJ. *G protein beta gamma subunits.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997;37:167-203.
- Clapham DE, Neer EJ. *New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling.* Nature. 1993;365(6445):403-6.
- Clapham DE. *Intracellular signalling: more jobs for G beta gamma.* Curr Biol. 1996;6(7):814-6.
- Colbran RJ, Soderling TR. *Calcium/calmodulin-independent autophosphorylation sites of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Studies on the effect of phosphorylation of threonine 305/306 and serine 314 on calmodulin binding using synthetic peptides.* J Biol Chem. 1990;265(19):11213-9.
- Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SRTj. *Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis.* Science. 1994;265(5177):1405-12.
- Connor M, Borgland SL, Christie MJ. *Continued morphine modulation of calcium channel currents in acutely isolated locus coeruleus neurons from morphine-dependent rats.* Br J Pharmacol. 1999;128(7):1561-9.
- Cooper DM, Karpen JW, Fagan KA, Mons NE. *Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases.* Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 1998;32:23-51.
- Cooper DM, Mons N, Karpen JW. *Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling.* Nature. 1995;374(6521):421-4.
- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. *Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins.* J Biol Chem. 1997;272(10):6525-33.
- Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, Omnaas JR, Porreca F. *Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor.* J Pharmacol Exp Ther. 1988;246(3):950-5.
- Cowan CW, Fariss RN, Sokal I, Palczewski K, Wensel TG. *High expression levels in cones of RGS9, the predominant GTPase accelerating protein of rods.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(9):5351-6.
- Cowan CW, He W, Wensel TG. *RGS proteins: lessons from the RGS9 subfamily.* Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 2001;65:341-59.
- Craft CM, Lolley RN, Seldin MF, Lee RH. *Rat pineal gland phosphducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse.* Genomics. 1991;10(2):400-9.

- Craft CM, Xu J, Slepak VZ, Zhan-Poe X, Zhu X, Brown B, Lolley RN. *PhLPs and PhLOPs in the phosducin family of G beta gamma binding proteins*. Biochemistry. 1998;37(45):15758-72.
- Crain SM, Shen KF. *Opioids can evoke direct receptor-mediated excitatory effects on sensory neurons*. Trends Pharmacol Sci. 1990;11(2):77-81.
- Cruciani RA, Dvorkin B, Morris SA, Crain SM, Makman MH. *Direct coupling of opioid receptors to both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide-binding proteins in F-11 neuroblastoma-sensory neuron hybrid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 ;90(7):3019-23.
- Cunningham ML, Waldo GL, Hollinger S, Hepler JR, Harden TK. *Protein kinase C phosphorylates RGS2 and modulates its capacity for negative regulation of Galpha 11 signaling*. J Biol Chem. 2001;276(8):5438-44.
- Cvejic S, Devi LA. *Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization*. J Biol Chem. 1997;272(43):26959-64
- Cvejic S, Trapaidze N, Cyr C, Devi LA. *Thr353, located within the COOH-terminal tail of the delta opiate receptor, is involved in receptor down-regulation*. J Biol Chem. 1996;271(8):4073-6.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. Nature. 1997;390(6655):88-91.
- Danner S, Lohse MJ. *Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(19):10145-50.
- De Vries L, Elenko E, McCaffery JM, Fischer T, Hubler L, McOuistan T, Watson N, Farguhar MG. *RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for Galphai heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles*. Mol Biol Cell. 1998;9(5):1123-34.
- De Vries L, Lou X, Zhao G, Zheng B, Farguhar MG. *GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(21):12340-5.
- De Vries L, Mousli M, Wurmser A, Farquhar MG. *GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(25):11916-20.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. *The regulator of G protein signaling family*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:235-71.
- DeBurman SK, Ptasienski J, Benovic JL, Hosey MM. *G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits*. J Biol Chem. 1996;271(37):22552-62.
- Di Chiara G, North RA. *Neurobiology of opiate abuse* Trends Pharmacol Sci. 1992;13(5):185-93.

- DiBello PR, Garrison TR, Apanovitch DM, Hoffman G, Shuye DJ, Mason K, Cockett MI, Dohlman HG. *Selective uncoupling of RGS action by a single point mutation in the G protein alpha-subunit*. J Biol Chem. 1998;273(10):5780-4.
- Dickenson AH. *Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids*. Br Med Bull. 1991;47(3):690-702.
- Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. J Biol Chem. 1995;270(12):6838-42.
- Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D. *Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes*. Exp Cell Res. 1994;210(2):287-97.
- Diverse-Pierluissi MA, Fischer T, Jordan JD, Schiff M, Ortiz DF, Farquhar MG, De Vries L. *Regulators of G protein signaling proteins as determinants of the rate of desensitization of presynaptic calcium channels*. J Biol Chem. 1999;274(20):14490-4.
- Dohlman HG, Song J, Apanovitch DM, DiBello PR, Gillen KM. *Regulation of G protein signalling in yeast*. Semin Cell Dev Biol. 1998;9(2):135-41.
- Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. *Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast Saccharomyces cerevisiae: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit)*. Mol Cell Biol. 1996;16(9):5194-209.
- Dohlman HG, Thorner J. *RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins*. J Biol Chem. 1997;272(7):3871-4.
- Druey KM, Blumer KJ, Kang VH, Kehrl JH. *Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family*. Nature. 1996;379(6567):742-6.
- Dulin NO, Pratt P, Tirappathi C, Niu J, Voyno-Yasenetskaya T, Dunn MJ. *Regulator of G protein signaling RGS3T is localized to the nucleus and induces apoptosis*. J Biol Chem. 2000;275(28):21317-23.
- Edwards AS, Scott JD. *A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond*. Curr Opin Cell Biol. 2000;12(2):217-21.
- El Kouhen R, Kouhen OM, Law PY, Loh HH. *The absence of a direct correlation between the loss of [D-Ala2, MePhe4, Gly5-ol]Enkephalin inhibition of adenylyl cyclase activity and agonist-induced mu-opioid receptor phosphorylation*. J Biol Chem. 1999;274(14):9207-15.
- Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE. *The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids*. Pain. 1994;56(1):69-75.

Eppler CM, Hulmes JD, Wang JB, Johnson B, Corbett M, Luthin DR, Uhl GR, Linden J. *Purification and partial amino acid sequence of a mu opioid receptor from rat brain.* Biol Chem. 1993;268(35):26447-51.

Escriba PV, Garcia-Sevilla JA. *Parallel modulation of receptor for activated C kinase I and protein kinase C-alpha and beta isoforms in brains of morphine-treated rats.* Br J Pharmacol. 1999;127(2):343-8.

Escriba PV, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. *Increased density of guanine nucleotide-binding proteins in the postmortem brains of heroin addicts.* Arch Gen Psychiatry. 1994;51(6):494-501.

Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.* Science. 1992;258(5090):1952-5.

Exton JH. *Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction.* Biochim Biophys Acta. 1994;1212(1):26-42.

Fan GH, Zhao J, Wu YL, Lou LG, Zhang Z, Jing Q, Ma L, Pei G. *N-Methyl-D-aspartate attenuates opioid receptor-mediated G protein activation and this process involves protein kinase C.* Mol Pharmacol. 1998;53(4):684-90.

Fan GH, Zhou TH, Zhang WB, Pei G. *Suppression of phospholipase C blocks Gi-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity.* Eur J Pharmacol. 1998;341(2-3):317-22.

Faurobert E, Hurley JB. *The core domain of a new retina specific RGS protein stimulates the GTPase activity of transducin in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(7):2945-50.

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR. *Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits.* Nature. 1992;356(6365):159-61.

Ferguson SS, Downey WE 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. *Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization.* Science. 1996;271(5247):363-6.

Fernandes M, Kluwe S, Coper H. *Development and loss of tolerance to morphine in the rat.* Psychopharmacology (Berl). 1982;78(3):234-8.

Fields TA, Casey PJ. *Phosphorylation of Gz alpha by protein kinase C blocks interaction with the beta gamma complex.* J Biol Chem. 1995;270(39):23119-25.

Fisher DJ, Tate CA, Phillips S. *Developmental regulation of the sarcoplasmic reticulum calcium pump in the rabbit heart.* Pediatr Res. 1992;31(5):474-9.

Fisher SA, Buttrick PM, Sukovich D, Periasamy M. *Characterization of promoter elements of the rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene required for expression in cardiac muscle cells.* Circ Res. 1993;73(4):622-8.

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. *Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors*. Science. 1998;280(5367):1271-4.

Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(19):8655-9.

Francis DL, Roy AC, Collier HO. *Morphine abstinence and quasi-abstinence effects after phosphodiesterase inhibitors and naloxone*. Life Sci. 1975;16(12):1901-6.

Frangioni JV, Neel BG. *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins*. Anal Biochem. 1993;210(1):179-87.

Franklin PH, Hoss W. *Opiates stimulate low Km GTPase in brain*. J Neurochem. 1984;43(4):1132-5.

Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K. *Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells*. J Neurochem. 1996;67(3):1309-16.

Fukushima N, Ueda H, Hayashi C, Katayama T, Miyamae T, Misu Y. *Species and age-dependent differences of functional coupling between opioid delta-receptor and G-proteins and possible involvement of protein kinase C in striatal membranes*. Neurosci Lett. 1994;176(1):55-8.

Fundytus ME, Coderre TJ. *Chronic inhibition of intracellular Ca²⁺ release or protein kinase C activation significantly reduces the development of morphine dependence*. Eur J Pharmacol. 1996;300(3):173-81.

Garzón J, Castro M, Sánchez-Blázquez P. *Influence of G_z and Gi₂ transducer proteins in the affinity of opioid agonists to micro receptors*. Eur J Neurosci. 1998;10(8):2557-64.

Garzón J, Castro MA, Juarros JL, Sánchez-Blázquez P. *Antibodies raised against the N-terminal sequence of delta opioid receptors blocked delta-mediated supraspinal antinociception in mice*. Life Sci. 1994;54(11):PL191-6.

Garzón J, de Antonio I, Sánchez-Blázquez P. *In vivo modulation of G proteins and opioid receptor function by antisense oligodeoxynucleotides*. Methods Enzymol. 2000;314:3-20.

Garzón J, García-España A, Sánchez-Blázquez P. *Opioids binding mu and delta receptors exhibit diverse efficacy in the activation of Gi₂ and G(x/z) transducer proteins in mouse periaqueductal gray matter*. J Pharmacol Exp Ther. 1997;281(1):549-57.

Garzón J, Martínez-Peña Y, Sánchez-Blázquez P. *Dissimilar efficacy of opioids to produce mu-mediated analgesia: role of G_{x/z} and Gi₂ transducer proteins*. Life Sci. 1994;55(11):PL205-12.

Garzón J, Martínez-Peña Y, Sánchez-Blázquez P. *Gx/z is regulated by mu but not delta opioid receptors in the stimulation of the low Km GTPase activity in mouse periaqueductal grey matter*. Eur J Neurosci. 1997;9(6):1194-200.

Garzón J, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, DeFelipe J, Rodríguez JR, Sánchez-Blázquez P. *Myr+-Gi2 alpha and Go alpha subunits restore the efficacy of opioids, clonidine and neurotensin giving rise to antinociception in G-protein knock-down mice*. Neuropharmacology. 1999;38(12):1861-73.

Garzón J, Rodríguez-Díaz M, López-Fando A, Sánchez-Blázquez P. *RGS9 proteins facilitate acute tolerance to mu-opioid effects*. Eur J Neurosci. 2001;13(4):801-11.

Garzón J, Sánchez-Blázquez P, Höllt V, Lee NM, Loh HH. *Endogenous opioid peptides: comparative evaluation of their receptor affinities in the mouse brain*. Life Sci. 1983;33 Suppl 1:291-4.

Garzón J, Sánchez-Blázquez P, Lee NM. *Effect of human B-endorphin on the binding of different opiates to mouse brain membranes*. Life Sci. 1983;33 Suppl 1:279-82.

Garzón J, Sánchez-Blázquez P. *Administration of myr(+)-G(i2)alpha subunits prevents acute tolerance (tachyphylaxis) to mu-opioid effects in mice*. Neuropharmacology. 2001;40(4):560-9.

Garzón J, Schulz R, Hertz A. *Evidence for the epsilon-type of opioid receptor in the rat vas deferens*. Mol Pharmacol. 1985;28(1):1-9.

Gaudet R, Bohm A, Sigler PB. *Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin*. Cell. 1996;87(3):577-88.

Gaudet R, Savage JR, McLaughlin JN, Willardson BM, Sigler PB. *A molecular mechanism for the phosphorylation-dependent regulation of heterotrimeric G proteins by phosducin*. Mol Cell. 1999;3(5):649-60.

Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Peluso J, Kieffer BL. *Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(11):6326-30.

George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF. *Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties*. J Biol Chem. 2000;275(34):26128-35.

Gilman AG. *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem. 1987;56:615-49.

Glick J, Meigs TE, Miron A, Casey PJ. *RGSZ1, a Gz-selective regulator of G protein signaling whose action is sensitive to the phosphorylation state of Gzalpha*. J Biol Chem. 1998;273(40):26008-13.

- Gold SJ, Ni YG, Dohlman HG, Nestler EJ. *Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain.* J Neurosci. 1997;17(20):8024-37.
- Goldberg IE, Rossi GC, Letchworth SR, Mathis JP, Ryan-Moro J, Leventhal L, Su W, Emmel D, Bolan EA, Pasternak GW. *Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain.* J Pharmacol Exp Ther. 1998;286(2):1007-13.
- Goldstein A, Lowney LI, Pal BK. *Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1971;68(8):1742-7.
- Goode NT, Hajibagheri MA, Parker PJ. *Protein kinase C (PKC)-induced PKC down-regulation. Association with up-regulation of vesicle traffic.* J Biol Chem. 1995;270(6):2669-73.
- Gorodinsky A, Harris DA. *Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin.* J Cell Biol. 1995;129(3):619-27.
- Granneman JG, Zhai Y, Zhu Z, Bannon MJ, Burchett SA, Schmidt CJ, Andrade R, Cooper J. *Molecular characterization of human and rat RGS 9L, a novel splice variant enriched in dopamine target regions, and chromosomal localization of the RGS 9 gene.* Mol Pharmacol. 1998;54(4):687-94.
- Granneman JG, Zhai Y, Zhu Z, Bannon MJ, Burchett SA, Schmidt CJ, Andrade Harta MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternwewis PC, Bollag G. *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13.* Science. 1998;280(5372):2112-4.
- Groshan KR, Norton JC, Craft CM, Travis GH. *Isolation and characterization of a cDNA for mouse retinal phosducin.* Exp Eye Res. 1993;57(2):253-5.
- Gucker S, Bidlack JM. *Protein kinase C activation increases the rate and magnitude of agonist-induced delta-opioid receptor down-regulation in NG108-15 cells.* Mol Pharmacol. 1992;42(4):656-65.
- Guerrero-Munoz F, Guerrero ML, Way EL. *Effect of morphine on calcium uptake by lysed synaptosomes.* J Pharmacol Exp Ther. 1979;211(2):370-4.
- Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ. *Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus.* J Neurochem. 1992;58(3):1168-71
- Harris RA, Loh HH, Way EL. *Effects of divalent cations, cation chelators and an ionophore on morphine analgesia and tolerance.* J Pharmacol Exp Ther. 1975;195(3):488-98.

- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G. *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13*. Science. 1998;280(5372):2112-4.
- Hasbi A, Allouche S, Sichel F, Stanasila L, Massotte D, Landemore G, Polastron J, Jauzac P. *Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism*. J Pharmacol Exp Ther. 2000;293(1):237-47.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization*. J Biol Chem. 1989;264(21):12657-65.
- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function*. FASEB J. 1990;4(11):2881-9.
- Hawes BE, Luttrell LM, van Biesen T, Lefkowitz RJ. *Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway*. J Biol Chem. 1996;271(21):12133-6.
- Hawes BE, Touhara K, Kurose H, Lefkowitz RJ, Inglese J. *Determination of the G beta gamma-binding domain of phosducin. A regulatable modulator of G beta gamma signaling*. J Biol Chem. 1994;269(47):29825-30.
- He W, Cowan CW, Wensel TG. *RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction*. Neuron. 1998;20(1):95-102.
- Hebert TE, Loisel TP, Adam L, Ethier N, Onge SS, Bouvier M. *Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization*. Biochem J. 1998;330 (Pt 1):287-93
- Hebert TE, Bouvier M. *Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization*. Biochem Cell Biol. 1998;76(1):1-11.
- Hedin KE, Bell MP, Kalli KR, Huntoon CJ, Sharp BM, McKean DJ. *Delta-opioid receptors expressed by Jurkat T cells enhance IL-2 secretion by increasing AP-1 complexes and activity of the NF-AT/AP-1-binding promoter element*. J Immunol. 1997;159(11):5431-40.
- Hekman M, Bauer PH, Sohlmann P, Lohse MJ. *Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the beta-adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner*. FEBS Lett. 1994;343(2):120-4.
- Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T. *RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(2):428-32.
- Hepler JR. *Emerging roles for RGS proteins in cell signalling*. Trends Pharmacol Sci. 1999;20(9):376-82.

- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. *Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits*. Nature. 1996;380(6571):258-62.
- Hermans E, Vanisberg MA, Geurts M, Maloteaux JM. *Down-regulation of neurotensin receptors after ligand-induced internalization in rat primary cultured neurons*. Neurochem Int. 1997;31(2):291-9.
- Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. *The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels*. Nature. 1987;325(6103):445-7.
- Heximer SP, Watson N, Linder M3E, Blumer KJ, Hepler JR. *RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(26):14389-93.
- Higashita R, Li L, Van Putten V, Yamamura Y, Zarinetchi F, Heasley L, Nemenoff RA. *Galpha16 mimics vasoconstrictor action to induce smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells through a Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway*. J Biol Chem. 1997;272(41):25845-50.
- Higgins JB, Casey PJ. *In vitro processing of recombinant G protein gamma subunits. Requirements for assembly of an active beta gamma complex*. J Biol Chem. 1994;269(12):9067-73.
- Hille B. *G protein-coupled mechanisms and nervous signaling*. Neuron. 1992;9(2):187-95.
- Hollt V (1983). *Multiple endogenous opioid peptides*. Trends Neurosci. 16: 24-26.
- Hong JX, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH. *Isolation and characterization of a novel B cell activation gene*. J Immunol. 1993;150(9):3895-904.
- Hoover JE, Strick PL. *Multiple output channels in the basal ganglia*. Science. 1993;259(5096):819-21.
- Hsia JA, Moss J, Hewlett EL, Vaughan M. *ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding*. J Biol Chem. 1984;259(2):1086-90.
- Huang C, Hepler JR, Gilman AG, Mumby SM. *Attenuation of Gi- and Gq-mediated signaling by expression of RGS4 or GAIP in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(12):6159-63.
- Huang FL, Yoshida Y, Cunha-Melo JR, Beaven MA, Huang KP. *Differential down-regulation of protein kinase C isozymes*. J Biol Chem. 1989;264(7):4238-43.
- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. *D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(21):11184-9.
- Hug H, Sarre TF. *Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?* Biochem J. 1993;291 (Pt 2):329-43.

Hunt TW, Giels TA, Casey PJ, Peralta EG. *RGS10 is a selective activator of G alpha i GTPase activity*. Nature. 1996;383(6596):175-7.

Hurley JH. *The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily*. Curr Opin Struct Biol. 1998;8(6):770-7.

Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. *Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes*. DNA Res. 2000;7(2):111-20.

Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. *Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence*. J Neurosci. 1999;19(1):56-63.

Ikeda K, Kobayashi T, Ichikawa T, Usui H, Kumanishi T. *Functional couplings of the delta- and the kappa-opioid receptors with the G-protein-activated K⁺ channel*. Biochem Biophys Res Commun. 1995;208(1):302-8.

Ikeda SR. *Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits*. Nature. 1996;380(6571):255-8.

Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. *Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types*. Brain Res. 1998;804(2):177-92.

Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd Jelsema CL, Axelrod J. *Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the beta gamma subunits of transducin and its inhibition by the alpha subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(11):3623-7.

Ingi T, Krumins AM, Chidiac P, Brothers GM, Chung S, Snow BE, Barnes CA, Lanahan AA, Siderovski DP, Ross EM, Gilman AG, Worley PF. *Dynamic regulation of RGS2 suggests a novel mechanism in G-protein signaling and neuronal plasticity*. J Neurosci. 1998;18(18):7178-88.

Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases*. Nature. 1992;359(6391):147-50.

Iyengar R. *Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases*. FASEB J. 1993;7(9):768-75.

Jacobowitz O, Chen J, Premont RT, Iyengar R. *Stimulation of specific types of Gs-stimulated adenylyl cyclases by phorbol ester treatment*. J Biol Chem. 1993;268(6):3829-32.

Jaken S. *Protein kinase C isozymes and substrates*. Curr Opin Cell Biol. 1996;8(2):168-73.

- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. *Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):3269-74.
- Jiang O, Takermori AE, Sultana M, Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI, Porreca f. *Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala2,Leu5,Cys6]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes*. J Pharmacol Exp Ther. 1991;257(3):1069-75.
- Jiang O, Takermori AE, Sultana M, Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI, Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. *Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells*. J Neurosci. 1994;14(4):1920-9.
- Jones DT, Reed RR. *Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium*. J Biol Chem. 1987;262(29):14241-9.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen O, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. *GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2*. Nature. 1998;396(6712):674-9.
- Jordan BA, Cvejic S, Devi LA. *Kappa opioid receptor endocytosis by dynorphin peptides*. DNA Cell Biol. 2000;19(1):19-27.
- Jordan BA, Devi LA. *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function*. Nature. 1999;399(6737):697-700.
- Kakunaga T, Kaneto H, Hano K. *Pharmacologic studies on analgesics. VII. Significance of the calcium ion in morphine analgesia*. J Pharmacol Exp Ther. 1966;153(1):134-41.
- Kaneko S, Nakamura S, Adachi K, Akaike A, Satoh M. *Mobilization of intracellular Ca²⁺ and stimulation of cyclic AMP production by kappa opioid receptors expressed in Xenopus oocytes*. Brain Res Mol Brain Res. 1994;27(2):258-64
- Katada T, Kusaakabe K, Oinuma M, Ui M. *A novel mechanism for the inhibition of adenylate cyclase via inhibitory GTP-binding proteins. Calmodulin-dependent inhibition of the cyclase catalyst by the beta gamma-subunits of GTP-binding proteins*. J Biol Chem. 1987;262(25):11897-900.
- Kato S, Fukuda K, Morikawa H, Shoda T, Mima H, Mori K. *Adaptations to chronic agonist exposure of mu-opioid receptor-expressing Chinese hamster ovary cells*. Eur J Pharmacol. 1998;345(2):221-8.
- Katz A, Simon MI. *A segment of the C-terminal half of the G-protein beta 1 subunit specifies its interaction with the gamma 1 subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(6):1998-2002.

- Katz A, Wu D, Simon MI. *Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C*. Nature. 1992;360(6405):686-9.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schulen V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. *GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes*. Nature. 1998;396(6712):683-7.
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M. *Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization*. J Biol Chem. 1996;271(32):19021-4.
- Khachaturian H, Lewis ME, Alessi NE, Watson SJ. *Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat hypothalamus*. J Comp Neurol. 1985;236(4):538-46.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. *The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(24):12048-52.
- Kieffer BL. *Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides*. Cell Mol Neurobiol. 1995;15(6):615-35.
- Kiley SC, Jaken S. *Activation of alpha-protein kinase C leads to association with detergent-insoluble components of GH4C1 cells*. Mol Endocrinol. 1990;4(1):59-68.
- King AP, Hall KE, MacDonald RL. *Kappa- and mu-opioid inhibition of N-type calcium currents is attenuated by 4beta-phorbol 12-myristate 13-acetate and protein kinase C in rat dorsal root ganglion neurons*. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289(1):312-20.
- Kishida S, Koyama S, Matsubara K, Kishida M, Matsuura Y, Kikuchi A. *Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator*. Oncogene. 1997;15(24):2899-907.
- Klauck TM, Faux MC, Labudda K, Langeberg LK, Jaken S, Scott JD. *Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein*. Science. 1996;271(5255):1589-92.
- Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B. *Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors*. Nature. 1992;358(6385):424-6.
- Kleuss C, Scherubl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B. *Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G proteins*. Science. 1993;259(5096):832-4.
- Knapp RJ, Malatynska E, Fang L, Li X, Babin E, Nguyen M, Satoro G, Varga EV, Hruby VJ, Roeske WR. *Identification of a human delta opioid receptor: cloning and expression*. Life Sci. 1994;54(25):PL463-9.

- Ko JL, Arvidsson U, Williams FG, Law PY, Elde R, Loh HH. *Visualization of time-dependent redistribution of delta-opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure.* Brain Res Mol Brain Res. 1999;69(2):171-85.
- Koch T, Krosiak T, Mayer P, Raulf E, Hollt V. *Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization.* J Neurochem. 1997;69(4):1767-70.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. *The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase.* J Biol Chem. 1993;268(11):8256-60.
- Koelle MR, Horvitz HR. *EGL-10 regulates G protein signaling in the C. elegans nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins.* Cell. 1996;84(1):115-25.
- Koenig JA, Edwardson JM. *Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors.* Trends Pharmacol Sci. 1997;18(8):276-87.
- Kolesnikov YA, Ferkany J, Pasternak GW. *Blockade of mu and kappa 1 opioid analgesic tolerance by NPC17742, a novel NMDA antagonist.* Life Sci. 1993;53(19):1489-94.
- Kolesnikov YA, Maccechini ML, Pasternak GW. *1-Aminocyclopropane carboxylic acid (ACPC) prevents mu and delta opioid tolerance.* Life Sci. 1994;55(18):1393-8.
- Kosterlitz HW, Magnan J, Paterson SJ. *The interaction of endogenous opioid peptides with the μ -, δ - and κ -binding sites in the guinea pig.* Br J Pharmacol. 1982;75:121.
- Kozasa T, Gilman AC. *Protein kinase C phosphorylates G12 alpha and inhibits its interaction with G beta gamma.* J Biol Chem. 1996;271(21):12562-7.
- Kozasa T, Jianag X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC. *p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13.* Science. 1998;280(5372):2109-11.
- Kraft AS, Anderson WB. *Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane.* Nature. 1983;301(5901):621-3.
- Krupnick JG, Benovic JL. *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998;38:289-319.
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. *Role of heteromer formation in GABAB receptor function.* Science. 1999;283(5398):74-7.
- Kuo CH, Taira E, Takaha N, Sohma H, Akino T, Fukada Y, Sanada K, Miki N. *Purification and characterization of three MEKA-like proteins in liver: association of a 94 kDa protein with beta gamma subunits of G-proteins.* Biochem Biophys Res Commun. 1993;191(3):1097-104.

- Lai HW, Minami M, Satoh M, Wong YH. *Gz coupling to the rat kappa-opioid receptor*. FEBS Lett. 1995;360(1):97-9.
- Lai J, Ma SW, Zhu RH, Rothman RB, Lentz KU, Porreca F. *Pharmacological characterization of the cloned kappa opioid receptor as a kappa 1b subtype*. Neuroreport. 1994;5(16):2161-4.
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. *The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein*. Nature. 1996;379(6563):311-9.
- Law PY, McGinn TM, Campbell KM, Erickson LE, Loh HH. *Agonist activation of delta-opioid receptor but not mu-opioid receptor potentiates fetal calf serum or tyrosine kinase receptor-mediated cell proliferation in a cell-line-specific manner*. Mol Pharmacol. 1997;51(1):152-60.
- Law PY, McGinn TM, Wick MJ, Erikson LJ, Evans C, Loh HH. *Analysis of delta-opioid receptor activities stably expressed in CHO cell lines: function of receptor density?* J Pharmacol Exp Ther. 1994;271(3):1686-94.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:389-430.
- Lee CH, Katz A, Simon MI. *Multiple regions of G alpha 16 contribute to the specificity of activation by the C5a receptor*. Mol Pharmacol. 1995;47(2):218-23.
- Lee JW, Joshi S, Chan JS, Wong YH. *Differential coupling of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors to G alpha16-mediated stimulation of phospholipase C*. J Neurochem. 1998;70(5):2203-11.
- Lee RH, Brown BM, Lolley RN. *Protein kinase A phosphorylates retinal phosphducin on serine 73 in situ*. J Biol Chem. 1990;265(26):15860-6.
- Lee RH, Fowler A, McGinnis JF, Lolley RN, Craft CM. *Amino acid and cDNA sequence of bovine phosphducin, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells*. J Biol Chem. 1990;265(26):15867-73.
- Lee RH, Ting TD, Liebman BS, mTobias DE, Lolley RN, Ho YK. *Regulation of retinal cGMP cascade by phosphducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosphducin and transducin*. J Biol Chem. 1992;267(35):25104-12.
- Lee RH, Whelan JP, Lolley RN, McGinnis JF. *The photoreceptor-specific 33 kDa phosphoprotein of mammalian retina: generation of monospecific antibodies and localization by immunocytochemistry*. Exp Eye Res. 1988;46(6):829-40.
- Lee SB, Rhee SG. *Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes*. Curr Opin Cell Biol. 1995;7(2):183-9.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, Daaka Y. *Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization*. Adv Pharmacol. 1998;42:416-20.

- Lehel C, Olah Z, Jakab G, Szallasi Z, Petrovics G, Harta G, Blumberg PM, Anderson WB. *Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes.* J Biol Chem. 1995;270(33):19651-8.
- Leslie FM. *Methods used for the study of opioid receptors.* Pharmacol Rev. 1987;39(3):197-249.
- Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu-Chen LY. *U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation.* J Biol Chem. 1999;274(17):12087-94.
- Li LY, Chang KJ. *The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors.* Mol Pharmacol. 1996;50(3):599-602
- Li S, Couet J, Lisanti MP. *Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases.* J Biol Chem. 1996;271(46):29182-90.
- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP. *Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin.* J Biol Chem. 1995;270(26):15693-701.
- Lin Y, Carpenter DO. *Direct excitatory opiate effects mediated by non-synaptic actions on rat medial vestibular neurons.* Eur J Pharmacol. 1994;262(1-2):99-106.
- Linder ME, Pang IH, Duronio RJ, Gordon JI, Sternweis PC, Gilman AG. *Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of Go alpha increases its affinity for beta gamma.* J Biol Chem. 1991;266(7):4654-9.
- Lipardi C, Mora R, Colomer V, Paladino S, Nitsch L, Rodríguez-Boulan E, Zurzolo C. *Caveolin transfection results in caveolae formation but not apical sorting of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in epithelial cells.* J Cell Biol. 1998;140(3):617-26.
- Lisanti MP, Schrerer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski, Vosaatka A, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M. *Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease.* J Cell Biol. 1994;126(1):111-26.
- Liu J, Oh P, Homer T, Roger RA, Schnitzer JE. *Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains.* J Biol Chem. 1997;272(11):7211-22.
- Loew A, Ho YK, Blundell T, Bax B. *Phosducin induces a structural change in transducin beta gamma.* Structure. 1998;6(8):1007-19.

- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE. *The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart*. Nature. 1987;325(6102):321-6.
- Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN. *Mu opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality*. Brain Res Mol Brain Res. 1998;54(2):321-6.
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors*. J Biol Chem. 1990;265(6):3202-11.
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science. 1990;248(4962):1547-50.
- Lolley RN, Craft CM, Lee RH. *Photoreceptors of the retina and pinealocytes of the pineal gland share common components of signal transduction*. Neurochem Res. 1992;17(1):81-9.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors*. Nature. 1977;267(5611):495-9.
- Lou L, Zhou T, Wang P, Pei G. *Modulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II activity by acute and chronic morphine administration in rat hippocampus: differential regulation of alpha and beta isoforms*. Mol Pharmacol. 1999;55(3):557-63.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with Folin phenol. Reagent*. J Biol Chem 1951;193:265-275.
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors*. Curr Opin Cell Biol. 1999;11(2):177-83.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes*. Science. 1999;283(5402):655-61.
- MacNicol M, Schulman H. *Cross-talk between protein kinase C and multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*. J Biol Chem. 1992;267(17):12197-201.
- Makino ER, Handy JW, Li T, Arshavsky VY. *The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein beta subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(5):1947-52.
- Malatynska E, Wang Y, Knapp RJ, Waite S, Calderon S, Rice K, Hruby VJ, Yamamura HI, Roeske WR. *Human delta opioid receptor: functional studies on stably transfected Chinese hamster ovary cells after acute and chronic treatment with the selective nonpeptidic agonist SNC-80*. J Pharmacol Exp Ther. 1996;278(3):1083-9.

- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, Schutz G. *Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB*. Science. 1996;273(5275):657-9.
- Maldonado R, Feger J, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. *Differences in physical dependence induced by selective mu or delta opioid agonists and by endogenous enkephalins protected by peptidase inhibitors*. Brain Res. 1990;520(1-2):247-54.
- Maldonado R, Severini C, Matthes HW, Kieffer BL, Melchiorri P, Negri L. *Activity of mu- and delta-opioid agonists in vas deferens from mice deficient in MOR gene*. Br J Pharmacol. 2001;132(7):1485-92.
- Mangoura D, Dawson G. *Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(7):2915-9.
- Mangoura D. *Mu-opioids activate tyrosine kinase focal adhesion kinase and regulate cortical cytoskeleton proteins cortactin and vinculin in chick embryonic neurons*. J Neurosci Res. 1997;50(3):391-401.
- Mansour A, Hoyersten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akol H. *The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores*. Brain Res. 1995;700(1-2):89-98.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akol H, Watson SJ. *Anatomy of CNS opioid receptors*. Trends Neurosci. 1988;11(7):308-14.
- Mansson E, Bare L, Yang D. *Isolation of a human kappa opioid receptor cDNA from placenta*. Biochem Biophys Res Commun. 1994;202(3):1431-7.
- Mao J, Yuan H, Xie W, Wu D. *Guanine nucleotide exchange factor GEF115 specifically mediates activation of Rho and serum response factor by the G protein alpha subunit Galpha13*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(22):12973-6.
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A. *GABA(B) receptors function as heterodimers*. Biochem Soc Trans. 1999;27(4):530-5.
- Martinez-Peña Y, Garzon J. *Distribution of low Km GTPase activity in mouse CNS: effect of chronic morphine*. Life Sci. 1993;52(16):PL123-8.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. *Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent*. J Comp Neurol. 1999;405(4):450-71.
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE. *Endomorphin-2 is an endogenous opioid in primary sensory afferent fibers*. Peptides. 1998;19(10):1783-9.
- Martin-Schild S, Zadina JE, Gerall AA, Vigh S, Kastin AJ. *Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord*. Peptides. 1997;18(10):1641-9.

Masters SB, Sullivan KA, Miller RT, Beideman B, Lopez NG, Ramachandran J, Bourne HR. *Carboxyl terminal domain of Gs alpha specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase*. Science. 1988;241(4864):448-51.

Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, Noel F, Hanoune J, Roques BP. *Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA*. Eur J Pharmacol. 1994;268(2):215-21.

Matsuoka M, Itoh H, Kozasa T, Kaziro Y. *Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(15):5384-8.

Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Mwur M, Dolle P, Tzayara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. *Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene*. Nature. 1996;383(6603):819-23.

Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL. *Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor*. J Neurosci. 1998;18(18):7285-95.

Mayer DJ, Mao J, Price DD. *The development of morphine tolerance and dependence is associated with translocation of protein kinase C*. Pain. 1995;61(3):365-74.

McArdle H, Mullaney I, Magee A, Unson C, Milligan G. *GTP analogues cause release of the alpha subunit of the GTP binding protein, GO, from the plasma membrane of NG108-15 cells*. Biochem Biophys Res Commun. 1988;152(1):243-51.

McCarthy KD, de Vellis J. *Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue*. J Cell Biol. 1980;85(3):890-902.

McKenzie FR, Milligan G. *Delta-opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi2*. Biochem J. 1990;267(2):391-8.

Meller N, Liu YC, Collins TL, Bonnefoy-Berard N, Baier G, Isakov N, Altman A. *Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function*. Mol Cell Biol. 1996;16(10):5782-91.

Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, Liu J, Schulman H, Yu L. *The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C*. J Neurosci. 1995;15(3 Pt 2):2396-406.

Miles MF, Barhite S, Sganga M, Elliott M. *Phosducin-like protein: an ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(22):10831-5.

- Milligan G, Grassie MA, Wise A, MacEwn DJ. *G-protein palmitoylation: regulation and functional significance*. Biochem Soc Trans. 1995;23(3):583-7.
- Min BH, Augustin LB, Felsehim RF, Fuchs JA, Loh HH. *Genomic structure analysis of promoter sequence of a mouse mu opioid receptor gene*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(19):9081-5.
- Misawa H, Ueda H, Katada T, Ui M, Satoh M. *A subtype of opioid kappa-receptor is coupled to inhibition of Gi1-mediated phospholipase C activity in the guinea pig cerebellum*. FEBS Lett. 1995;361(1):106-10.
- Miyamae T, Fukushima N, Misu Y, Ueda H. *Delta opioid receptor mediates phospholipase C activation via Gi in Xenopus oocytes*. FEBS Lett. 1993;333(3):311-4.
- Mochly-Rosen D, Henrich CJ, Cheever L, Khaner H, Simpson PC. *A protein kinase C isozyme is translocated to cytoskeletal elements on activation*. Cell Regul. 1990;1(9):693-706.
- Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J. *Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(9):3997-4000.
- Moffett S, Brown DA, Linder ME. *Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts*. J Biol Chem. 2000;275(3):2191-8.
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. *Mu-opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G(o)-type GTP-binding protein*. J Neurosci. 1994;14(6):3842-51.
- Monier S, Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM, Kuzchalia TV. *Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol*. FEBS Lett. 1996;388(2-3):143-9.
- Morikawa H, Fukuda K, Kato S, Mori K, Higashida H. *Coupling of the cloned mu-opioid receptor with the omega-conotoxin-sensitive Ca²⁺ current in NG108-15 cells*. J Neurochem. 1995;65(3):1403-6.
- Morishita R, Nakayama H, Isobe T, Matsuda T, Hashimoto Y, Okano T, Fukuda Y, Mizuno K, Ohno S, Kozawa O. *Primary structure of a gamma subunit of G protein, gamma 12, and its phosphorylation by protein kinase C*. J Biol Chem. 1995;270(49):29469-75.
- Morris AJ, Rudge SA, Mahlum CE, Jenco JM. *Regulation of phosphoinositide-3-kinase by G protein beta gamma subunits in a rat osteosarcoma cell line*. Mol Pharmacol. 1995;48(3):532-9.
- Moullac B, Caron M, Bonin H, Dennis M, Bouvier M. *Agonist-modulated palmitoylation of beta 2-adrenergic receptor in Sf9 cells*. J Biol Chem. 1992;267(30):21733-7.

Mucha H, König L, Kunath B, Winkler J. [The signal function of motor side effects in psychopharmacotherapy from the viewpoint of correlative relations between motor activity, tonus and psyche]. *Psychiatr Neurol Med Psychol (Leipz)*. 1971;23(7):394-401.

Mullaney I, Carr IC, Burt AR, Wilson M, Anderson NG, Milligan G. Agonist-mediated tyrosine phosphorylation of isoforms of the *shc* adapter protein by the delta opioid receptor. *Cell Signal*. 1997;9(6):423-9.

Muller S, Straub A, Schroder S, Bauer PH, Lohse MJ. Interactions of phosducin with defined G protein beta gamma-subunits. *J Biol Chem*. 1996;271(20):11781-6.

Mumby SM. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(2):148-54.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. *VIP21/caveolin* is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10339-43.

Murray AW. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5(1):5-11.

Murray SR, Evans CJ, von Zastrow M. Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J Biol Chem*. 1998;273(39):24987-91.

Murthy KS, Makhlouf GM. Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Mol Pharmacol*. 1996;50(4):870-7.

Nagase T, Ishikawa K, Nakajima D, Ohira M, Seki N, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 1997;4(2):141-50.

Nakano K, Chen J, Tan GE, Yoshida T, Flynn JM, Butensky MW. Rethinking the role of phosducin: light-regulated binding of phosducin to 14-3-3 in rod inner segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4693-8.

Nakano K, Osugi T, Kuo CH, Higuchi H, Miki N. Tyrosine phosphorylation of a 58 kDa protein induced by morphine in SK-N-SH cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200(2):797-801.

Narita M, Feng Y, Makimura M, Hoskins B, Ho IK. A protein kinase inhibitor, H-7, inhibits the development of tolerance to opioid antinociception. *Eur J Pharmacol*. 1994;271(2-3):543-5.

Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF. Involvement of spinal protein kinase Cgamma in the attenuation of opioid mu-receptor-mediated G-

protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-Ol⁵]enkephalin. *J Neurosci.* 2001;21(11):3715-20.

Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Narita M, Dun NJ, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF. *Enhanced mu-opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase Cgamma isoform.* *J Biol Chem.* 2001;276(18):15409-14.

Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF. *Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered mu-opioid receptor agonist in the mouse.* *Eur J Pharmacol.* 1995;280(2):R1-3.

Natochin M, Artemyev NO. *A single mutation Asp229 Ser confers upon Gs alpha the ability to interact with regulators of G protein signaling.* *Biochemistry.* 1998;37(39):13776-80.

Natochin M, Artemyev NO. *Substitution of transducin ser202 by asp abolishes G-protein/RGS interaction.* *J Biol Chem.* 1998;273(8):4300-3

Neal MJ, Paterson SJ, Cunningham JR. *Enhancement of retinal acetylcholine release by DAMGO: possibly a direct opioid receptor-mediated excitatory effect.* *Br J Pharmacol.* 1994;113(3):789-94.

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF. *The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins.* *Nature.* 1994;371(6495):297-300.

Neer EJ. *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals.* *Cell.* 1995;80(2):249-57.

Nekrasova ER, Berman DM, Rustandi RR, Hamm HE, Gilman AG, Arshavsky VY. *Activation of transducin guanosine triphosphatase by two proteins of the RGS family.* *Biochemistry.* 1997;36(25):7638-43.

Nekrasova ER, Berman DM, Rustandi RR, Hamm HE, Gilman AG, Arshavsky VY. *Activation of transducin guanosine triphosphatase by two proteins of the RGS family.* *Biochemistry.* 1997;36(25):7638-43.

Nestler EJ, Aghajanian GK. *Molecular and cellular basis of addiction.* *Science.* 1997;278(5335):58-63.

Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES. *Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways.* *Mol Psychiatry.* 1996;1(3):190-9.

Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallman JF. *Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus.* *Brain Res.* 1989;476(2):230-9

Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. *Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity.* *Neuron.* 1993;11(6):995-1006.

- Newton AC, Williams DS. *Does protein kinase C play a role in rhodopsin desensitization?* Trends Biochem Sci. 1993;18(8):275-7.
- Newton AC. *Regulation of protein kinase C.* Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):161-7.
- Nishizuka Y. *The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.* Nature. 1988;334(6184):661-5.
- Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. *The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S.* Nature. 1993;366(6456):654-63.
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. *μ and δ receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(15):5487-91.
- Nott MW. *Potentiation of morphine analgesia by cocaine in mice.* Eur J Pharmacol. 1968;5(1):93-9.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. *Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization.* J Biol Chem. 1999;274(45):32248-57.
- Offermanns S, Simon MI. *G α 15 and G α 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C.* J Biol Chem. 1995;270(25):15175-80.
- Oh P, Schnitzer JE. *Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default.* Mol Biol Cell. 2001;12(3):685-98.
- Okamoto CT. *Endocytosis and transcytosis.* Adv Drug Deliv Rev. 1998;29(3):215-228.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.* J Biol Chem. 1998;273(10):5419-22.
- Olianas MC, Onali P. *Participation of delta opioid receptor subtypes in the stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb.* J Pharmacol Exp Ther. 1995;275(3):1560-7.
- Olson GA, Olson RD, Kastin AJ. *Endogenous opiates: 1993.* Peptides. 1994;15(8):1513-56.
- Olson KG, Welch SP. *The effects of dynorphin A (1-13) and U50, 488H on free intracellular calcium in guinea pig cerebellar synaptosomes.* Life Sci. 1991;48(6):575-81.
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Abbadie C, Chang A, Zuckerman A, Rossi G, Pasternak GW. *Identification and characterization of three new alternatively spliced μ -opioid receptor isoforms.* Mol Pharmacol. 1999;56(2):396-403.

- Pan YX, Xu J, Bolan E, Chang A, Mahurter L, Rossi G, Pasternak GW. *Isolation and expression of a novel alternatively spliced mu opioid receptor isoform, MOR-1F*. FEBS Lett. 2000;466(2-3):337-40.
- Parton RG. *Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae*. J Histochem Cytochem. 1994;42(2):155-66.
- Parton RG. *Caveolae and caveolins*. Curr Opin Cell Biol. 1996;8(4):542-8.
- Pasternak GW and Snyder SH. *Identification of novel high affinity opiate receptor binding in rat brain*. Nature 1975;253:563-5.
- Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. *Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C*. Mol Pharmacol. 1995;48(2):173-7.
- Peng YW, Robishaw JD, Levine MA, Yau KW. *Retinal rods and cones have distinct G protein beta and gamma subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(22):10882-6.
- Pepperl DJ, Shah-Basu S, VanLeeuwen D, Granneman JG, MacKenzie RG. *Regulation of RGS mRNAs by cAMP in PC12 cells*. Biochem Biophys Res Commun. 1998;243(1):52-5.
- Pierce TL, Grahek MD, Wessendorf MW. *Immunoreactivity for endomorphin-2 occurs in primary afferents in rats and monkey*. Neuroreport. 1998;9(3):385-9.
- Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ, Hales TG. *Voltage-dependent inhibition of Ca²⁺ channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors*. Mol Pharmacol. 1996;50(4):947-56.
- Piros ET, Prather PL, Loh HH, Law PY, Evans CJ, Hales TG. *Ca²⁺ channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells*. Mol Pharmacol. 1995;47(5):1041-9.
- Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, Lefkowitz RJ. *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies*. J Biol Chem. 1996;271(40):24907-13.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors*. Science. 1992;257(5074):1264-7.
- Polakiewicz RD, Schieferl SM, Dorner LF, Kansra V, Comb MJ. *A mitogen-activated protein kinase pathway is required for mu-opioid receptor desensitization*. J Biol Chem. 1998;273(20):12402-6.
- Porreca F, Takemori AE, Sultana M, Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI. *Modulation of mu-mediated antinociception in the mouse involves opioid delta-2 receptors*. J Pharmacol Exp Ther. 1992;263(1):147-52.

- Porzig H. *Pharmacological modulation of voltage-dependent calcium channels in intact cells*. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1990;114:209-62.
- Potenza MN, Gold SJ, Roby-Shemkowitz A, Lemer MR, Nestler EJ. *Effects of regulators of G protein-signaling proteins on the functional response of the mu-opioid receptor in a melanophore-based assay*. J Pharmacol Exp Ther. 1999;291(2):482-91.
- Prather PL, Tsai AW, Law PY. *Mu and delta opioid receptor desensitization in undifferentiated human neuroblastoma SHSY5Y cells*. J Pharmacol Exp Ther. 1994;270(1):177-84.
- Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. *Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function*. J Cell Biol. 1996;132(1-2):77-90.
- Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. *Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase*. J Biol Chem. 1996;271(23):13900-7.
- Pronin AN, Satpaev DK, Slepak VZ, Benovic JL. *Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain*. J Biol Chem. 1997;272(29):18273-80.
- Puri SK, Cochin J, Volicer L. *Effect of morphine sulfate on adenylate cyclase and phosphodiesterase activities in rat corpus striatum*. Life Sci. 1975;16(5):759-67.
- Puttfarcken PS, Cox BM. *Morphine-induced desensitization and down-regulation at mu-receptors in 7315C pituitary tumor cells*. Life Sci. 1989;45(20):1937-42.
- Pyne NJ, Murphy GJ, Milligan G, Houslay MD. *Treatment of intact hepatocytes with either the phorbol ester TPA or glucagon elicits the phosphorylation and functional inactivation of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi*. FEBS Lett. 1989;243(1):77-82.
- Raffa RB, Martinez RP, Connelly CD. *G-protein antisense oligodeoxyribonucleotides and mu-opioid supraspinal antinociception*. Eur J Pharmacol. 1994;258(1-2):R5-7.
- Rahman Z, Gold SJ, Potenza MN, Cowan CW, Ni YG, He W, Wensel TG, Nestler EJ. *Cloning and characterization of RGS9-2: a striatal-enriched alternatively spliced product of the RGS9 gene*. J Neurosci. 1999;19(6):2016-26.
- Randall AD. *The molecular basis of voltage-gated Ca²⁺ channel diversity: is it time for T?*. J Membr Biol. 1998;161(3):207-13.
- Rasmussen K, Beitner-Johnson DB, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ. *Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates*. J Neurosci. 1990;10(7):2308-17.

- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. *Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors*. Mol Pharmacol. 1994;45(2):330-4.
- Raynor K, Kong H, Hines J, Kong G, Benovic J, Yasuda K, Bell GI, Reisine T. *Molecular mechanisms of agonist-induced desensitization of the cloned mouse kappa opioid receptor*. J Pharmacol Exp Ther. 1994;270(3):1381-6.
- Remmers AE, Clark MJ, Liu XY, Medzihradsky F. *Delta opioid receptor down-regulation is independent of functional G protein yet is dependent on agonist efficacy*. J Pharmacol Exp Ther. 1998;287(2):625-32.
- Rens-Domiano S, Hamm HE. *Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins*. FASEB J. 1995;9(11):1059-66.
- Rhim H, Miller RJ. *Opioid receptors modulate diverse types of calcium channels in the nucleus tractus solitarius of the rat*. J Neurosci. 1994;14(12):7608-15.
- Robb S, Cheek TR, Hannan FL, Hall LM, Midgley JM, Evans PD. *Agonist-specific coupling of a cloned Drosophila octopamine/tyramine receptor to multiple second messenger systems*. EMBO J. 1994;13(6):1325-30.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC. *Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity*. Science. 2000;288(5463):154-7.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC. *Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers*. J Biol Chem. 2000;275(11):7862-9.
- Rodríguez-Díaz M, Garzón J, Sánchez-Blázquez P. *The delta2-opioid receptor subtype stimulates phosphoinositide metabolism in mouse periaqueductal gray matter*. Life Sci. 1998;62(16):PL253-8.
- Ron D, Mochly-Rosen D. *An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(2):492-6.
- Rossi G, Pan YX, Cheng J, Pasternak GW. *Blockade of morphine analgesia by an antisense oligodeoxynucleotide against the mu receptor*. Life Sci. 1994;54(21):PL375-9.
- Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, Naor Z. *Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(18):7305-8.
- Rothberg KG, Ying YS, Kamen BA, Anderson RG. *Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate*. J Cell Biol. 1990;111(6 Pt 2):2931-8.

- Rothman RB, Xu H, Char GU, Kim A, De Costa BR, Rice KC, Zimmerman DM. *Phenylpiperidine opioid antagonists that promote weight loss in rats have high affinity for the kappa 2B (enkephalin-sensitive) binding site*. Peptides. 1993;14(1):17-20.
- Roy S, Liu HC, Loh HH. *Mu-opioid receptor-knockout mice: the role of mu-opioid receptor in gastrointestinal transit*. Brain Res Mol Brain Res. 1998;56(1-2):281-3.
- Ruiz-Gomez A, Humrich J, Murga C, Quitterer U, Lohse MJ, Mayor F Jr. *Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2*. J Biol Chem. 2000;275(38):29724-30.
- Saitoh O, Kubo Y, Miyatani Y, Asano T, Nakata H. *RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K⁺ currents*. Nature. 1997;390(6659):525-9.
- Sánchez-Blázquez P, DeAntonio I, Rodríguez-Díaz M, Garzón J. *Antisense oligodeoxynucleotide targeting distinct exons of the cloned mu-opioid receptor distinguish between endomorphin-1 and morphine supraspinal antinociception in mice*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 1999;9(3):253-60.
- Sánchez-Blázquez P, García-España A, Garzón J. *Antisense oligodeoxynucleotides to opioid mu and delta receptors reduced morphine dependence in mice: role of delta-2 opioid receptors*. J Pharmacol Exp Ther. 1997;280(3):1423-31.
- Sánchez-Blázquez P, Garzón J. *Cholera toxin and pertussis toxin on opioid- and alpha 2-mediated supraspinal analgesia in mice*. Life Sci. 1991;48(18):1721-7.
- Sánchez-Blázquez P, Garzón J. *Delta opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception*. J Pharmacol Exp Ther. 1998;285(2):820-7.
- Sánchez-Blázquez P, Garzón J. *Evaluation of delta receptor mediation of supraspinal opioid analgesia by in vivo protection against the beta-funaltrexamine antagonist effect*. Eur J Pharmacol. 1989;159(1):9-23.
- Sánchez-Blázquez P, Juarros JL, Martínez-Peña Y, Castro MA, Garzón J. *Gx/z and Gi2 transducer proteins on mu/delta opioid-mediated supraspinal antinociception*. Life Sci. 1993;53(23):PL381-6.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez MD, Garzón J. *Antibodies directed against the mu-opioid receptor alleviated multiple signs of morphine withdrawal in mice*. Life Sci. 1996;59(8):PL87-92.
- Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Díaz M, DeAntonio I, Garzón J. *Endomorphin-1 and endomorphin-2 show differences in their activation of mu opioid receptor-regulated G proteins in supraspinal antinociception in mice*. J Pharmacol Exp Ther. 1999;291(1):12-8.
- Saper CB. *Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections*. J Comp Neurol. 1985;237(1):21-46.

- Sargiacomo M, Sudol M, Tang Z, Lisanti MP. *Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells.* J Cell Biol. 1993;122(4):789-807.
- Sarne Y, Rubovitch V, Fields A, Gafni M. *Dissociation between the inhibitory and stimulatory effects of opioid peptides on cAMP formation in SK-N-SH neuroblastoma cells.* Biochem Biophys Res Commun. 1998;246(1):128-31.
- Savage JR, McLaughlin JN, Skiba NP, Hamm HE, Willardson BM. *Functional roles of the two domains of phosducin and phosducin-like protein.* J Biol Chem. 2000;275(39):30399-407.
- Scheer A, Gierschik P. *S-prenylated cysteine analogues inhibit receptor-mediated G protein activation in native human granulocyte and reconstituted bovine retinal rod outer segment membranes.* Biochemistry. 1995;34(15):4952-61.
- Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Handel M, Holtt V. *Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells.* J Neurochem. 2000;74(1):414-22.
- Schnitzer JE, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J, Oh P. *Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins.* Science. 1995;269(5229):1435-9.
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules.* J Cell Biol. 1994;127(5):1217-32.
- Schoffelmeer AN, Yao YH, Giannini TL, Hiller JM, Ofri D, Roques BP, Simon EJ. *Cross-linking of human [125I]beta-endorphin to opioid receptors in rat striatal membranes: biochemical evidence for the existence of a mu/delta opioid receptor complex.* J Pharmacol Exp Ther. 1990;253(1):419-26.
- Schreff M, Schuytz S, Wiborny D, Holtt V. *Immunofluorescent identification of endomorphin-2-containing nerve fibers and terminals in the rat brain and spinal cord.* Neuroreport. 1998;9(6):1031-4.
- Schroder S, Lohse MJ. *Inhibition of G-protein betagamma-subunit functions by phosducin-like protein.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(5):2100-4.
- Schroder S, Lohse MJ. *Quantification of the tissue levels and function of the G-protein regulator phosducin-like protein (PhlP).* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000;362(4-5):435-9.
- Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA. *Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains.* J Biol Chem. 1998;273(2):1150-7.

- Schuh KJ, Walsh SL, Bigelow GE, Preston KL, Stitzer ML. *Buprenorphine, morphine and naloxone effects during ascending morphine maintenance in humans*. J Pharmacol Exp Ther. 1996;278(2):836-46.
- Schulman H, Hanson PI. Multifunctional *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase*. Neurochem Res. 1993;18(1):65-77.
- Schulz K, Danner S, Bauer P, Schroder S, Lohse MJ. *Expression of phosducin in a phosducin-negative cell line reveals functions of a Gbetagamma-binding protein*. J Biol Chem. 1996;271(37):22546-51.
- Schulz R, Whemeyer A, Murphy J, Schulz K. *Phosducin, beta-arrestin and opioid receptor migration*. Eur J Pharmacol. 1999;375(1-3):349-57.
- Schulz R. *The pharmacology of phosducin*. Pharmacol Res. 2001;43(1):1-10.
- Schulz S, Hollt V. *Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo*. Eur J Neurosci. 1998;10(3):1196-201
- Schulz S, Schreff M, Koch T, Zimprich A, Gramsch C, Elde R, Hollt V. *Immunolocalization of two mu-opioid receptor isoforms (MOR1 and MOR1B) in the rat central nervous system*. Neuroscience. 1998;82(2):613-22.
- Segredo V, Burford NT, Lamah J, Sadee W. *A constitutively internalizing and recycling mutant of the mu-opioid receptor*. J Neurochem. 1997;68(6):2395-404.
- Seki N, Sugano S, Suzuki Y, Nakagawara A, Ohira M, Muramatsu M, Saito T, Hori T. *Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human RGS5, a novel G-protein signaling regulator gene*. J Hum Genet. 1998;43(3):202-5.
- Self DW, McClenahan AW, Beitner-Johnson D, Terwilliger RZ, Nestler EJ. *Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to heroin self-administration*. Synapse. 1995;21(4):312-8.
- Selley DE, Breivogel CS, Childers SR. *Opioid inhibition of adenylyl cyclase in membranes from pertussis toxin-treated NG108-15 cells*. J Recept Signal Transduct Res. 1998;18(1):25-49.
- Shahabi NA, Daaka Y, McAllen K, Sharp BM. *Delta opioid receptors expressed by stably transfected jurkat cells signal through the map kinase pathway in a ras-independent manner*. J Neuroimmunol. 1999;94(1-2):48-57.
- Shapira M, Baumhaker Y, Sarne Y. *Long-term regulation of opioid receptors in neuroblastoma and lymphoma cell lines*. J Neuroimmunol. 1997;76(1-2):145-52.
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. *Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977;74(8):3365-72.
- Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA. *Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(2):590-8.

- Sharp BM, McKean DJ, McAllen K, Shahabi NA. *Signaling through delta opioid receptors on murine splenic T cells and stably transfected Jurkat cells*. Ann N Y Acad Sci. 1998;840:420-4.
- Shen J, Benedict Gomes A, Gallagher A, Stafford K, Yoburn BC. *Role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced mu-opioid receptor downregulation and tolerance in mice*. Synapse. 2000;38(3):322-7.
- Shuey DJ, Betty M, Jones PG, Khawaja XZ, Cockett MI. *RGS7 attenuates signal transduction through the G(alpha q) family of heterotrimeric G proteins in mammalian cells*. J Neurochem. 1998;70(5):1964-72.
- Siderovski DP, Diverse-Pierluissi MA, De Vries L. *The GoLoco motif: a Galphai/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor*. Trends Biochem Sci. 1999;24(9):340-1.
- Siderovski DP, Hessel A, Chung S, Mak TW, Tyers M. *A new family of regulators of G-protein-coupled receptors?* Curr Biol. 1996;6(2):211-2.
- Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG, Spiegel AM. *G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain*. J Biol Chem. 1991;266(9):5363-6.
- Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, Matthes H, Lannes B, Micheletti G, Mattei MG, Charron G, Bloch B, Kieffer B. *kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(15):7006-10.
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL. *Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal*. EMBO J. 1998;17(4):886-97.
- Skiba NP, Yang CS, Huang T, Bae H, Hamm HE. *The alpha-helical domain of Galphat determines specific interaction with regulator of G protein signaling 9*. J Biol Chem. 1999;274(13):8770-8.
- Smart D, Hirst RA, Hirota K, Grandy DK, Lambert DG. *The effects of recombinant rat mu-opioid receptor activation in CHO cells on phospholipase C, [Ca²⁺]_i and adenylyl cyclase*. Br J Pharmacol. 1997;120(6):1165-71.
- Smart D, Lambert DG. *Delta-opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca²⁺ from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells*. J Neurochem. 1996;66(4):1462-7.
- Smart D, Smith G, Lambert DG. *Halothane and isoflurane enhance basal and carbachol-stimulated inositol(1,4,5)triphosphate formation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Biochem Pharmacol. 1994;47(6):939-45.

- Smart D, Smith G, Lambert DG. *Mu-opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5)trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein.* J Neurochem. 1994;62(3):1009-14.
- Smart D, Smith G, Lambert DG. *Mu-opioids activate phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening.* Biochem J. 1995;305 (Pt 2):577-81.
- Snow BE, Antonio L, Suggs S, Siderovski DP. *Cloning of a retinally abundant regulator of G-protein signaling (RGS-r/RGS16): genomic structure and chromosomal localization of the human gene.* Gene. 1998;206(2):247-53.
- Snow BE, Betts L, Mangion J, Sondek J, Siderovski DP. *Fidelity of G protein beta-subunit association by the G protein gamma-subunit-like domains of RGS6, RGS7, and RGS11.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6489-94.
- Soderling TR. *CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity.* Curr Opin Neurobiol. 2000;10(3):375-80.
- Soderling TR. *Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases II and IV.* Biochim Biophys Acta. 1996;1297(2):131-8.
- Sofuoglu M, Portoghese PS, Takemori AE. *Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes.* J Pharmacol Exp Ther. 1991;257(2):676-80.
- Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. *Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution.* Nature. 1996;379(6563):369-74.
- Song KS, Li Shengwen, Okamoto T, Ouilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. *Copurification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains.* J Biol Chem. 1996;271(16):9690-7.
- Song L, De Sarno P, Jope RS. *Muscarinic receptor stimulation increases regulators of G-protein signaling 2 mRNA levels through a protein kinase C-dependent mechanism.* J Biol Chem. 1999;274(42):29689-93.
- Sora I, Funada M, Uhl GR. *The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin-induced analgesia.* Eur J Pharmacol. 1997;324(2-3):R1-2.
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. *Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(4):1544-9.
- Spengler D, Waebeer C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. *Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor.* Nature. 1993;365(6442):170-5.

- Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW. *Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits*. Mol Pharmacol. 1996;50(2):293-8.
- Sternweis PC, Northup JK, Smigel MD, Gilman AG. *The regulatory component of adenylate cyclase. Purification and properties*. J Biol Chem. 1981;256(22):11517-26.
- Stiene-Martin A, Knapp PE, Martin K, Gurwell JA, Ryan S, Thornton SR, Smith FL, Hauser KF. *Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: impact on gliogenesis in vivo*. Glia 2001;36:78-88.
- Stone LS, Fairbanks CA, Laughlin TM, Nguyen HO, Bushy TM, Wessendorf MW, Wilcox GL. *Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and -2*. Neuroreport. 1997;8(14):3131-5
- Strassheim D, Law PY, Loh HH. *Contribution of phospholipase C-beta3 phosphorylation to the rapid attenuation of opioid-activated phosphoinositide response*. Mol Pharmacol. 1998;53(6):1047-53.
- Strassheim D, Malbon CC. *Phosphorylation of Gi alpha 2 attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells*. J Biol Chem. 1994;269(19):14307-13.
- Stryer L, Bourne HR. *G proteins: a family of signal transducers*. Annu Rev Cell Biol. 1986;2:391-419.
- Sullivan R, Chateauneuf A, Coulombe N, Kolakowski LF Jr, Johnson MP, Hebert TE, Ethier N, Belley M, Metteis K, Abramovitz M, O'Neill GP, Ng GY. *Coexpression of full-length gamma-aminobutyric acid(B) (GABA(B)) receptors with truncated receptors and metabotropic glutamate receptor 4 supports the GABA(B) heterodimer as the functional receptor*. J Pharmacol Exp Ther. 2000;293(2):460-7.
- Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H. *Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones*. J Physiol. 1990;431:585-608.
- Surrat CK, Johnson PS, Moriwaki A, Seidleck BK, Blaschak CJ, Wang JB, Uhl GR. *-mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity*. J Biol Chem. 1994;269(32):20548-53.
- Suzuki T, Tsuji M, Mori T, Misawa M, Endoh T, Nagase H. *Effect of the highly selective and nonpeptide delta opioid receptor agonist TAN-67 on the morphine-induced place preference in mice*. J Pharmacol Exp Ther. 1996;279(1):177-85.
- Tallent M, Dichter MA, Bell GI, Reisine T. *The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells*. Neuroscience. 1994;63(4):1033-40.

- Tanaka C, Saito N. *Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system.* *Neurochem Int.* 1992;21(4):499-512.
- Tanaka H, Iwami C, Kuo CH, Ding Y, Do E, Irie Y, Miki N. *Analysis of the T beta gamma-binding domain of MEKA/phosducin.* *Neurochem Int.* 1997;31(4):625-34.
- Tang WJ, Gilman AG. *Adenylyl cyclases.* *Cell.* 1992;70(6):869-72.
- Tang WJ, Gilman AG. *Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits.* *Science.* 1991;254(5037):1500-3.
- Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG. *Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase.* *J Biol Chem.* 1991;266(13):8595-603
- Tang WJ, Stanzel M, Gilman AG. *Truncation and alanine-scanning mutants of type I adenylyl cyclase.* *Biochemistry.* 1995;34(44):14563-72
- Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. *Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases.* *J Biol Chem.* 1994;269(8):6093-100.
- Taylor DA, Fleming WW. *Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids.* *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(1):11-8.
- Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ. *A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function.* *Brain Res.* 1991;548(1-2):100-10.
- Terwilliger RZ, Ortiz J, Guitart X, Nestler EJ. *Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus.* *J Neurochem.* 1994;63(5):1983-6.
- Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. *Structure of RGS4 bound to AlF4-activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis.* *Cell.* 1997;89(2):251-61.
- Thibault C, Feng Wang J, Charnas R, Mirel D, Barhite S, Miles MF. *Cloning and characterization of the rat and human phosducin-like protein genes: structure, expression and chromosomal localization.* *Biochim Biophys Acta.* 1999;1444(3):346-54.
- Thorson JA, Yu LW, Hsu AL, Shih NY, Graves PR, Tanner JW, Allen PM, Piwnicka-Worms H, Shaw AS. *14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity.* *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5229-38.
- Thulin CD, Savage JR, McLaughlin JN, Truscott SM, Old WM, Ahn NG, Resing KA, Hamm HE, Bitensky MW, Willardson BM. *Modulation of the G protein regulator phosducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding.* *J Biol Chem.* 2001;276(26):23805-15.

Tian M, Broxmeyer HE, Fan Y, Lai Z, Zhang S, Aronica S, Cooper S, Bigsby RM, Steinmetz R, Engle SJ, Mestek A, Pollock JD, Lehman MN, Jansen HT, Ying M, Stambrook PJ, Tischfield JA, Yu L. *Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice.* J Exp Med. 1997;185(8):1517-22.

Tokuyama S, Feng Y, Wakabayashi H, Ho IK. *Possible involvement of protein kinases in physical dependence on opioids: studies using protein kinase inhibitors, H-7 and H-8.* Eur J Pharmacol. 1995;284(1-2):101-7.

Trejo J, Hammes SR, Coughlin SR. *Termination of signaling by protease-activated receptor-1 is linked to lysosomal sorting.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(23):13698-702.

Tseng CC, Zhang XY. *Role of regulator of G protein signaling in desensitization of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor.* Endocrinology. 1998;139(11):4470-5.

Tseng LF, Narita M, Suganuma C, Mizoguchi H, Ohsawa M, Nagase H, Kampine JP. *Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse.* J Pharmacol Exp Ther. 2000;292(2):576-83.

Tsu RC, Chan JS, Wong YH. *Regulation of multiple effectors by the cloned delta-opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase.* J Neurochem. 1995;64(6):2700-7.

Tsu RC, Lai HW, Allen RA, Wong YH. *Differential coupling of the formyl peptide receptor to adenylate cyclase and phospholipase C by the pertussis toxin-insensitive Gz protein.* Biochem J. 1995;309 (Pt 1):331-9.

Tu Y, Popov S, Slaughter C, Ross EM. *Palmitoylation of a conserved cysteine in the regulator of G protein signaling (RGS) domain modulates the GTPase-activating activity of RGS4 and RGS10.* J Biol Chem. 1999;274(53):38260-7.

Tzivion G, Luo Z, Avruch J. *A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity.* Nature. 1998;394(6688):88-92.

Ueda H, Inoue M, Matsumoto T. *Protein kinase C-mediated inhibition of mu-opioid receptor internalization and its involvement in the development of acute tolerance to peripheral mu-agonist analgesia.* J Neurosci. 2001;21(9):2967-73.

Ueda H, Miyamae T, Fukushima N, Takeshima H, Fukuda K, Sasaki Y, Misu Y. *Opioid mu- and kappa-receptor mediate phospholipase C activation through Gi1 in Xenopus oocytes.* Brain Res Mol Brain Res. 1995;32(1):166-70.

Ueda H, Miyamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Sasaki Y, Iwamura T, Misu Y. *Protein kinase C involvement in homologous desensitization of delta-opioid receptor coupled to Gi1-phospholipase C activation in Xenopus oocytes.* J Neurosci. 1995;15(11):7485-99.

- Uhl GR, Childers S, Pasternak G. *An opiate-receptor gene family reunion*. Trends Neurosci. 1994;17(3):89-93.
- Ulibarri I, Garcia-Sevilla JA, Ugedo L. *Modulation of brain alpha 2-adrenoceptor and mu-opioid receptor densities during morphine dependence and spontaneous withdrawal in rats*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1987;336(5):530-7.
- Unterwald EM, Rubenfeld JM, Imai Y, Wang JB, Uhl GR, Kreek MJ. *Chronic opioid antagonist administration upregulates mu opioid receptor binding without altering mu opioid receptor mRNA levels*. Brain Res Mol Brain Res. 1995;33(2):351-5.
- Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Blitterswijk WJ. *Protein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3*. Biochem J. 2000;347 Pt 3:781-5.
- Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Dijk MC, Van Blitterswijk J. *14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation*. Biochem J. 2000;345 Pt 2:297-306.
- Van Dijk MC, Hilkmann H, van Blitterswijk WJ. *Platelet-derived growth factor activation of mitogen-activated protein kinase depends on the sequential activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C-zeta and Raf-1*. Biochem J. 1997;325 (Pt 2):303-7.
- Ventayol P, Busquets X, Garcia-Sevilla JA. *Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1997;355(4):491-500.
- Von Zastrow M, Kobilka BK. *Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors*. J Biol Chem. 1992;267(5):3530-8.
- Wahlestedt C. *Antisense oligonucleotide strategies in neuropharmacology*. Trends Pharmacol Sci. 1994;15(2):42-6.
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR. *The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2*. Cell. 1995;83(6):1047-58.
- Wang JB, Johson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. *Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment*. FEBS Lett. 1994;338(2):217-22.
- Wang Z, Arden J, Sadee W. *Basal phosphorylation of mu opioid receptor is agonist modulated and Ca²⁺-dependent*. FEBS Lett. 1996;387(1):53-7.
- Watson AJ, Aragay AM, Slepak VZ, Simon MI. *A novel form of the G protein beta subunit Gbeta5 is specifically expressed in the vertebrate retina*. J Biol Chem. 1996;271(45):28154-60.

- Watson AJ, Katz A, Simon MI. *A fifth member of the mammalian G-protein beta-subunit family. Expression in brain and activation of the beta 2 isotype of phospholipase C.* J Biol Chem. 1994;269(35):22150-6.
- Watson N, Linder ME, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ. *RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein alpha-subunits.* Nature. 1996;383(6596):172-5.
- Wedegaertner PB, Bourne HR. *Activation and depalmitoylation of Gs alpha.* Cell. 1994;77(7):1063-70.
- Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. *Lipid modifications of trimeric G proteins.* J Biol Chem. 1995;270(2):503-6.
- Wedegaertner PB. *Lipid modifications and membrane targeting of G alpha.* Biol Signals Recept. 1998;7(2):125-35.
- Werling LL, McMahon PN, Cox BM. *Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(16):6393-7.
- Whistler JL, von Zastrow M. *Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(17):9914-9.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. *Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor.* Nature. 1998;396(6712):679-82.
- Whitehead IP, Khosravi-Far R, Kirk H, Trigo-Gonzalez G, Der CJ, Kay R. *Expression cloning of lsc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors.* J Biol Chem. 1996;271(31):18643-50.
- Wickman KD, Clapham DE. *G-protein regulation of ion channels.* Curr Opin Neurobiol. 1995;5(3):278-85.
- Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS, Vaidya VA, Miserendino MJ, Rubin CS, Duman RS, Nestler EJ. *Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens.* J Pharmacol Exp Ther. 1996;276(1):306-15.
- Wilkins JF, Bitensky MW, Willardson BM. *Regulation of the kinetics of phosphatidylinositol phosphorylation in retinal rods.* J Biol Chem. 1996;271(32):19232-7.
- Wilson MA, Burt AR, Milligan G, Anderson NG. *Mitogenic signalling by delta opioid receptors expressed in rat-1 fibroblasts involves activation of the p70s6k/p85s6k S6 kinase.* Biochem J. 1997;325 (Pt 1):217-22.
- Witherow DS, Wang Q, Levay K, Cabrera JL, Chen J, Willars GB, Slepak VZ. *Complexes of the G protein subunit gbeta 5 with the regulators of G protein signaling*

RGS7 and RGS9. Characterization in native tissues and in transfected cells. J Biol Chem. 2000;275(32):24872-80.

Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schroder H, Raulf E, Buhling F, Holtt V. *Replacement of threonine 394 by alanine facilitates internalization and resensitization of the rat mu opioid receptor.* Mol Pharmacol. 1999;55(2):263-8.

Wong SK, Martin BR, Tolkovsky AM. *Pertussis toxin substrate is a guanosine 5'-[beta-thio]diphosphate-, N-ethylmaleimide-, Mg²⁺- and temperature-sensitive GTP-binding protein.* Biochem J. 1985;232(1):191-7.

Wong YH, Federman A, Pace AM, Zachary I, Evans T, Pouyssegur J, Bourne HR. *Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation.* Nature. 1991;351(6321):63-5.

Wuster M, Schulz R, Herz A. *Specificity of opioids towards the mu-, delta- and epsilon-opiate receptors.* Neurosci Lett. 1979;15(2-3):193-8.

Xiang B, Yu GH, Guo J, Chen L, Hu W, Pei G, Ma L. *Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization.* J Biol Chem. 2001;276(7):4709-16.

Xie CW, Lewis DV. *Involvement of cAMP-dependent protein kinase in mu-opioid modulation of NMDA-mediated synaptic currents.* J Neurophysiol. 1997;78(2):759-66.

Xu H, Partilla JS, de Costa BR, Rice KC, Rothman RB. *Differential binding of opioid peptides and other drugs to two subtypes of opioid delta nrx binding sites in mouse brain: further evidence for delta receptor heterogeneity.* Peptides. 1993 Sep;14(5):893-907.

Xu J, Wu D, Slepak VZ, Simon MI. *The N terminus of phosducin is involved in binding of beta gamma subunits of G protein.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(6):2086-90.

Yabaluri N, Medzihradsky F. *Down-regulation of mu-opioid receptor by full but not partial agonists is independent of G protein coupling.* Mol Pharmacol. 1997;52(5):896-902.

Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC. *The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity.* Cell. 1997;91(7):961-71.

Yamane HK, Fung BK. *Covalent modifications of G-proteins.* Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1993;33:201-41.

Yan SZ, Huang ZH, Shaw RS, Tang WJ. *The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase.* J Biol Chem. 1997;272(19):12342-9.

Yang H, Lu D, Raizada MK. *Angiotensin II-induced phosphorylation of the AT1 receptor from rat brain neurons*. Hypertension. 1997;30:351-7.

Yasuda K, Espinosa R, Takeda J, Le Beau MM, Bell GI. *Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2*. Genomics. 1994;19(3):596-7.

Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. *Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(14):6736-40.

Yoshimasa T, Sibley DR, Bouvier M, Lefkowitz RJ, Caron MG. *Cross-talk between cellular signalling pathways suggested by phorbol-ester-induced adenylate cyclase phosphorylation*. Nature. 1987;327(6117):67-70.

Yoshimura M, Ikeda H, Tabakoff B. *Mu-opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase*. Mol Pharmacol. 1996;50(1):43-51.

Yoshimura M, Wu PH, Hoffman PL, Tabakoff B. *Overexpression of type 7 adenylyl cyclase in the mouse brain enhances acute and chronic actions of morphine*. Mol Pharmacol. 2000;58(5):1011-6.

Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB. *Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy*. J Biol Chem. 1997;272(46):28869-74.

Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ. *Mu opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. J Pharmacol Exp Ther. 1993;265(1):254-62.

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. *A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor*. Nature. 1997;386(6624):499-502.

Zadina JE, Harrison LM, Ge LJ, Kastin AJ, Chang SL. *Differential regulation of mu and delta opiate receptors by morphine, selective agonists and antagonists and differentiating agents in SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. J Pharmacol Exp Ther. 1994;270(3):1086-96.

Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ, Porreca F. *Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model*. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1996;36:379-401.

Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP. *Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha1 subunit*. Nature. 1997;385(6615):442-6.

Zeng W, Xu X, Popov S, Mukhopadhyay S, Chidiac P, Swistok J, Danho W, Yagaloff KA, Fisher SL, Ross EM, Muallem S, Wilkie TM. *The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling*. J Biol Chem. 1998;273(52):34687-90.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. Cell. 1996;87(4):619-28.

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Aber MJ, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG. *Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization*. Receptors Channels. 1997;5(3-4):193-9.

Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG. *Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(12):7157-62.

Zhang L, Yu Y, Mackin S, Weight FF, Uhl GR, Wang JB. *Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters*. J Biol Chem. 1996;271(19):11449-54.

Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T. *Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy*. Neuroscience. 1998;82(1):223-40.

Zhang Z, Xin SM, Wu GX, Zhang WB, Ma L, Pei G. *Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C*. J Neurochem. 1999;73(4):1502-9.

Zhao J, Pei G, Huang YL, Zhong FM, Ma L. *Carboxyl terminus of delta opioid receptor is required for agonist-dependent receptor phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun. 1997;238(1):71-6.

Zhou J, Stanners J, Kabouridis P, Han H, Tsoukas CD. *Inhibition of TCR/CD3-mediated signaling by a mutant of the hematopoietically expressed G16 GTP-binding protein*. Eur J Immunol. 1998;28(5):1645-55.

Zhu Y, y col. (1997) Soc. Neurosci. Abstr. 23,584.

Zimprich A, Simon T, Hollt V. *Cloning and expression of an isoform of the rat mu opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist induced desensitization from rMOR1*. FEBS Lett. 1995;359(2-3):142-6.

Zukin RS, Eghabali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A. *Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988; 85(11):4061-5.

