

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Interacción entre el sistema endocannabinoide y el sistema esfingosina-1-fosfato en cerebro de rata

Autor:

Alan Kerstjens Medina

Director:

Rafael Rodríguez Puertas

Co-director:

Iván Manuel Vicente

© 2017, Alan Kerstjens Medina

Leioa, 27 de junio de 2017

Índice

1. Introducción	1
1.1. Sistema endocannabinoide	1
1.2. Sistema esfingosina-1-fosfato	1
1.3. Interacción entre el sistema eCB y el sistema S1P	2
2. Objetivos	2
3. Materiales y métodos	3
Animales	3
Preparación de membranas	3
Ensayos de competición con radioligandos	3
Obtención de cortes de cerebro	3
Tinción de tionina	3
Autorradiografía de receptores para neurotransmisores	4
Análisis de autorradiogramas	4
4. Resultados	5
4.1. Competición de W146 y CYM5442 por los sitios de unión de [³ H]-CP55940 en corteza cerebral de rata	5
4.2. Desplazamiento de [³ H]-CP55940 por W146 en las capas del cortex cerebral	6
4.3. Desplazamiento de [³ H]-CP55940 por W146 en otras áreas cerebrales	7
5. Discusión	9
6. Referencias	12

1. Introducción

1.1. Sistema endocannabinoide (eCB)

Los endocannabinoides (eCB) son una serie de compuestos lipídicos bioactivos que se caracterizan por ser amidas, ésteres o éteres con cabeza polar del ácido araquidónico¹. Los eCB mejor estudiados son la anandamida y el 2-araquidonoilglicerol². Estos compuestos son capaces de unirse a y activar los receptores acoplados a proteína G (GPCR) CB₁ y CB₂, aunque se ha propuesto la existencia de otros receptores de eCB³. La distribución de ambos receptores es distinta: los receptores CB₁ se ubican principalmente en el sistema nervioso central (SNC)⁴⁻⁸, mientras que los CB₂ son típicos del sistema inmune y hematopoyético^{9,10}. La distribución de CB₁ en el cerebro ha sido caracterizada en roedores^{6,7} y en humanos¹¹, ubicándose en regiones relacionadas con el ánimo, coordinación motora, memoria y aprendizaje. Adicionalmente, a nivel celular, los CB₁ se concentran en axones y terminales nerviosos presinápticos, aunque pueden encontrarse en estructuras postsinápticas y glia en menor medida^{12,13}. Existe evidencia de la presencia de receptores CB₂ en el cerebro^{14,15}, pero asociados a células gliales y en densidades muy bajas¹⁶. En este trabajo se evalúa el sistema eCB en el cerebro en condiciones fisiológicas, por lo que nos centraremos en el receptor CB₁.

Los receptores CB₁ se encuentran acoplados mayoritariamente a proteínas G heterotriméricas con subunidad G_{ai/o}, por lo que su activación lleva a la inhibición de la ruta proteína quinasa A (PKA)¹⁷, aunque se han descrito casos en los que se acoplan a proteínas G_{as}¹⁸⁻²¹ o G_{aq}²². La activación de CB₁ también estimula la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), regulando funciones celulares como el crecimiento celular o la apoptosis^{23,24}. Adicionalmente, si está acoplado a G_{ai/o}, CB₁ parece inhibir canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y estimular canales de K⁺ de rectificación interna²⁵ mediante mecanismos dependientes de PKA, provocando una hiperpolarización²⁶.

La función más importante de los eCB en el SNC es la de neuromoduladores retrógrados. Los eCB se sintetizan a demanda a partir de fosfolípidos en la membrana post-sináptica en respuesta a una despolarización por la entrada de Ca²⁺ [27,28]. Tras ser liberados al espacio sináptico actúan sobre receptores CB₁ de células proximales, entre ellas la neurona presináptica, en la que inhiben la liberación de neurotransmisores como glutamato²⁹ y GABA³⁰ o modulan la liberación de acetilcolina (ACh)³¹, glicina³², serotonina³³, dopamina³⁴ y noradrenalina³⁵.

1.2. Sistema esfingosina 1-fosfato (S1P)

La esfingosina 1-fosfato (S1P) es un lípido bioactivo producido por la fosforilación de la esfingosina, una reacción catalizada por la esfingosina quinasa, de la cual se han descrito dos isoformas: SphK1 y SphK2³⁶. La S1P puede revertir a esfingosina gracias a la actividad de la S1P fosfatasa³⁷ o puede ser degradada a fosfoetanolamina y hexadecanal por acción de la S1P liasa³⁸. La S1P ejerce la mayor parte de sus efectos actuando sobre los GPCRs de S1P, de los cuales se han descrito 5 subtipos (S1P₁-S1P₅)³⁹. La distribución de receptores de S1P se ha estudiado extensamente⁴⁰⁻⁴². El receptor S1P₁ es el subtipo de expresión más extendida, expresándose en casi todos los tipos celulares. Concretamente en el SNC abunda el S1P₁ en sustancia gris⁴¹ y el S1P₅ en sustancia blanca^{43,44}. No todas las funciones de la S1P pueden atribuirse en su integridad a la activación de receptores S1P⁴⁵. Es más, algunos autores han definido la S1P como un segundo mensajero sintetizado, por ejemplo, en respuesta a factores de crecimiento (GF)⁴⁶ y con capacidad de regular la proliferación celular junto a la ceramida en un reóstato^{47,48}, además de movilizar Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico y medio extracelular de forma independiente de G_{aq}⁴⁵.

El sistema S1P es un sistema ubicuo que cumple funciones diversas en multitud de sistemas, incluidos el sistema inmune⁴⁹, sistema vascular⁵⁰ y sistema nervioso⁵¹. Concretamente en el SNC el sistema S1P está implicado en el crecimiento del cono axonal⁵², la extensión y retracción de neuritas⁵³, regulación de la actividad neuronal^{54,55}, supervivencia de oligodendrocitos y mantenimiento de la mielinización⁵⁶, así como en la migración y proliferación de astrocitos^{57,58}. En este sentido, la señalización del sistema S1P es compleja y parece ser muy flexible, variando entre receptores, tipos celulares y estado celular. Los receptores S1P pueden encontrarse asociados a proteínas $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q}$ y $G_{\alpha 12/13}$, aunque mayoritariamente se asocian a proteínas $G_{\alpha i/o}$, en cuyo caso la activación del receptor desencadena en la activación de la ruta de la fosfolipasa C (PLC), ruta de la MAPK y ruta de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), y en la inhibición de la ruta de la PKA^{59,60}.

1.3. Relación entre el sistema eCB y el sistema S1P

Durante los últimos años han surgido evidencias de una posible interacción entre el sistema eCB y el sistema S1P, en concreto en el SNC, aunque la relevancia fisiológica de esta interacción se desconoce. Los primeros hallazgos que apuntaban a una posible interacción se basaban en similitudes en los mecanismos de señalización (dado que ambos sistemas se basan en GPCRs)^{5,61}, en la naturaleza de los ligandos endógenos que se unen a ellos (que en ambos casos son lípidos)^{62,63}, en la homología de secuencias y estructuras de los GPCR (ambos tipos de receptor pertenecen a la familia de GPCR de tipo A)⁶⁴, y en la proximidad filogenética entre ambos tipos de GPCR⁶⁵. Posteriormente surgieron evidencias muy sólidas de esta posible interacción, como la colocalización de la actividad eCB y S1P en determinadas regiones del SNC, entre ellas el núcleo estriado, hipocampo, cerebelo y determinadas regiones de la corteza cerebral^{66,67}, o una posible interacción a nivel metabólico, dado que la activación de CB_1 lleva a la activación de esfingomielinasas y la generación de ceramida, el precursor de la esfingosina⁶⁸.

Recientemente se han encontrado más evidencias de que existe esta hipotética relación entre sistemas, las cuales serán discutidas a fondo en la discusión. Todas estas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos por nuestro grupo.

2. Objetivo del estudio

Esclarecer la interacción entre el sistema eCB y el sistema S1P en cerebro de rata, concretamente la posibilidad de que agonistas y antagonistas sintéticos para $S1P_1$ interaccionen con CB_1 . Atendiendo a esta reactividad cruzada de ligandos, también se pretende caracterizar mejor la sensibilidad de distintas regiones cerebrales ricas en $CB_1/S1P_1$ a la unión de estos ligandos, relacionando diferencias en sensibilidad con poblaciones distintas de receptores. Finalmente, se postularán hipótesis para explicar la relevancia fisiológica de esta interacción en el SNC.

3. Materiales y métodos

Animales. En este estudio se emplearon ratas macho Sprague-Dawley (2 meses de edad, 200 - 250g). Los animales se criaron con ciclos de día:noche (12:12h), alimento y agua *ad libitum*, y a 22 °C y 65% de humedad. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Local de Ética para la investigación con animales de la Universidad del País Vasco (EAEC/388/2015), acorde con lo establecido por la directriz europea 2010/63/EU sobre experimentación con animales.

Preparación de membranas. Cerebros de ratas Sprague-Dawley fueron diseccionados aislando la corteza cerebral, y las muestras congeladas a -80 °C. Cada muestra fue homogeneizada en 60 volúmenes de tampón 1 (250mM sacarosa, 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,4) disgregándolas mediante 15 pulsos con un Potter-Elvehjem a 800 rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 1500 rpm y 4 °C durante 5 min, y el sobrenadante resultante centrifugado de nuevo a 1400 rpm y 4 °C durante 15 min. El sedimento se resuspendió en tampón 2 (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,4) y volvió a ser centrifugado en las mismas condiciones durante 15 min. El sedimento final fue conservado a -80 °C. Mediante un ensayo Bradford⁶⁹ se determinó que la concentración de membranas final en las alícuotas era de 0,5388 mg/ml.

Ensayos de competición con radioligandos. En cada ensayo el radioligando [³H]-CP55940 (PerkinElmer, Waltham, MA; AE = 150,2 Ci/mmol), un agonista CB₁/CB₂, fue desplazado con concentraciones crecientes de otro fármaco frío (no marcado radiactivamente): SR141716A, antagonista CB₁ (Tocris, Avonmouth, Reino Unido), CYM5442, agonista S1P₁ (Tocris), o W146, antagonista S1P₁ (Tocris). Todos los ensayos se realizaron en una suspensión de membranas en tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% m/v BSA, pH 7,4) a una concentración de 0,1 mg/ml. La unión total fue analizada en ausencia de desplazante y la unión inespecífica añadiendo concentraciones saturantes (10⁻⁵ M) del agonista CB₁ WIN55,212-2 (Tocris). Las concentraciones finales para cada condición fueron de 2,5 mM Tris-HCl, 50 nM EDTA y 150 nM de MgCl₂. Para evitar la adhesión de lípidos a los tubos se emplearon tubos de borosilicato tratados con el reactivo siliconizante Sigmacote® (Merck-SigmaAldrich, Darmstadt, Alemania). Todas las condiciones se incubaron 2 h a 37 °C con agitación. La reacción se paró por dilución y por enfriamiento añadiendo tampón de ensayo a 4 °C. Seguidamente las membranas fueron transferidas a un filtro de microfibrillas de vidrio Whatman® GF/C (Merck-SigmaAldrich) prehidratado con tampón de ensayo, con la ayuda de un *harvester* de 48 pocillos Dottikon CH-5606 (Inotech, Dottikon, Suiza), realizando 3 filtraciones con tampón de ensayo frío. Cada región del filtro correspondiente a una condición fue transferida a un vial con 5 ml de líquido de centelleo OptiPhase HiSafe II (PerkinElmer) y tras 16 h de estabilización la radiactividad fue medida en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb 2200CA (PerkinElmer). Los valores de la unión inespecífica se restaron a los valores de cada condición para determinar la unión específica. El análisis no lineal de las curvas de inhibición se realizó con el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Obtención de cortes de cerebro. Ratas Sprague-Dawley (n = 3) fueron anestesiadas y sus cerebros diseccionados y congelados a -80 °C de inmediato. Los cerebros se pasaron a -20 °C para ser cortados sagitalmente en su integridad utilizando un criostato Microm HM550 (Thermo-Fisher Scientific, Walldorf, Alemania). Secciones de 20 µm se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se almacenaron a -20 °C hasta realizar el experimento.

Tinción de tionina. Para facilitar la identificación de las distintas áreas del cerebro cortes representativos fueron descongelados e hidratados sumergiendo el corte durante 5 min en sucesivas disoluciones de etanol en orden descendente (100%, 96%, 70% y 50%). Posteriormente las secciones se sumergieron en solución de tionina durante 5 min. Tras lavar los cortes con agua desionizada se deshidrató de nuevo el tejido sumergiéndolo en sucesivas soluciones de etanol en orden ascendente.

Autorradiografía de receptores para neurotransmisores. Cortes sagitales de cerebro de rata fueron descongelados y atemperados durante 30 min. Seguidamente, con el fin de eliminar posibles ligandos endógenos de GPCR, los cortes se preincubaron en tampón de ensayo (50 mM Tris-HCl, 1% m/v BSA, pH 7,4) 30 min a 30 °C con agitación. Posteriormente, los cortes se incubaron 2 h a 37 °C con agitación en tampón de ensayo con [³H]CP55940 a 3 nM y concentraciones crecientes de W146. La unión total se analizó en ausencia de W146, y la unión no específica se analizó a concentraciones saturantes (10⁻⁵ M) de CP55940. Tras la incubación los cortes fueron lavados 2 veces durante 15 min en tampón de ensayo frío y sumergidos brevemente en agua destilada. Los cortes se dejaron secar en frío (4 °C) durante 16 h. Al día siguiente los cortes se expusieron a film de autorradiografía Kodak Biomax MR (Kodak, Rochester, NY), junto a un estándar de ³H (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO) en un casete cerrado herméticamente y a temperatura ambiente. Los films se revelaron tras 21 días de exposición con una reveladora automática.

Análisis de autorradiogramas. Los films revelados se escanearon y analizaron utilizando la variante Fiji⁷⁰ del *software* ImageJ⁷¹. Las densidades ópticas en escala de grises se normalizaron a $\mu\text{Ci/g}$ tejido equivalente utilizando para el calibrado los valores de radioactividad del estándar de ³H coexpuesto junto a los cortes. Se analizaron diferentes áreas del cerebro, entre ellas las distintas capas de la corteza cerebral, sustancia gris y blanca del cerebelo, cuerpo calloso, tálamo, hipotálamo, tronco y núcleo estriado (Fig. 1). Para cada condición y región se restó al valor medido tanto la señal del fondo como la unión inespecífica. El análisis no lineal de las curvas de inhibición se realizó con el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

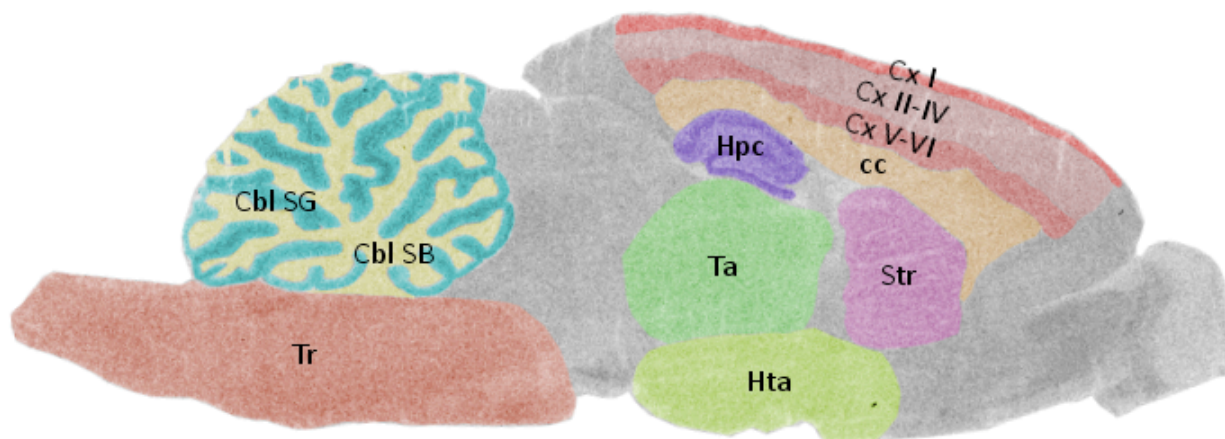


Figura 1. Autorradiograma de unión total de [³H]-CP55940 en un corte sagital de cerebro de rata (profundidad $\approx 1,90\text{mm}$), con las áreas analizadas resaltadas por colores. Cbl SG = Sustancia gris del cerebelo; Cbl SB = Sustancia blanca del cerebelo; Tr = Tronco; Ta = Tálamo; Hta = Hipotálamo; Str = Núcleo estriado; Hpc = Hipocampo; cc = Cuerpo calloso; Cx I = Capa I de la corteza; Cx II-IV = Capas II-IV de la corteza; Cx V-VI = Capas V-VI de la corteza.

4. Resultados

4.1. Competición de W146 y CYM5442 por los sitios de unión de [³H]-CP55940 en corteza cerebral de rata

Algunos estudios^{72,73} demostraron que ligandos, en un principio específicos de S1P₁, son capaces de unirse a receptores CB₁. Decidimos analizar esta unión en membranas de homogenizado de corteza cerebral de rata empleando el agonista CB₁/CB₂ [³H]-CP55940, que se incubó en membranas de homogenizado de corteza cerebral de rata junto a otro ligando frío (sin marcar): el antagonista de S1P₁, W146, o el agonista de S1P₁, CYM5442. Los resultados mostraron que tanto W146 como CYM5442 son capaces de desplazar parcialmente a [³H]-CP55940 según un modelo de inhibición competitiva con un solo sitio de unión (Fig. 2). La afinidad del CYM5442 por los sitios de unión era considerablemente inferior ($\log K_i = -4,934$, $R^2 = 0,7138$) que la afinidad del antagonista W146 ($\log K_i = -8,762$, $R^2 = 0,7632$). Curiosamente la afinidad del W146 por los sitios de unión de [³H]-CP55940 es incluso algo mayor que la del antagonista total de CB₁, SR14716A ($\log K_i = -8,204$, $R^2 = 0,9571$). Sin embargo, SR14716A llega a inhibir el 100% de los lugares de fijación de [³H]-CP55940, mientras que W146 solo inhibe el 44% de estos lugares (Fig. 2).

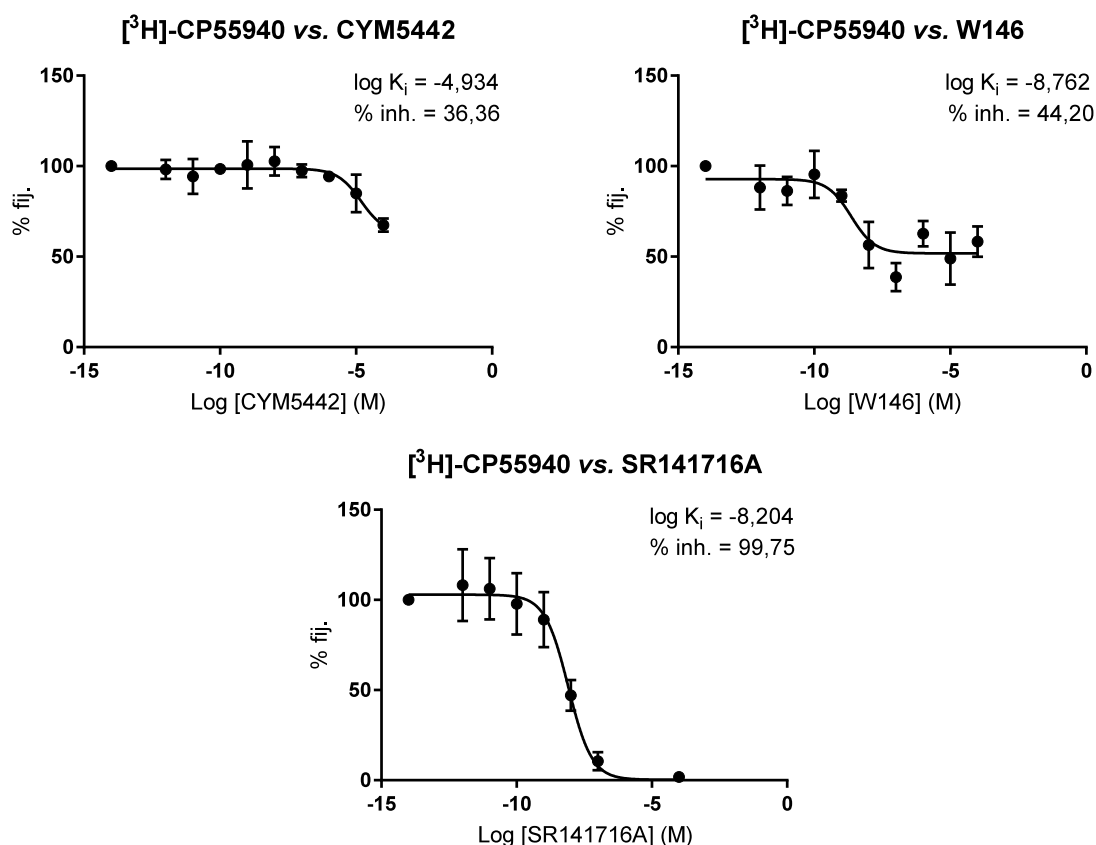


Figura 2. Curvas del desplazamiento de [³H]-CP55940 por ligandos de S1P₁. Membranas de homogenizado de corteza cerebral de rata se incubaron junto a 0,55 nM de [³H]-CP55940 y concentraciones crecientes de CYM5442 o W146. Los datos se normalizaron conociendo la concentración de proteína en las membranas (0,5388 mg/ml) y se ajustaron a un modelo de inhibición competitiva con un solo sitio de unión mediante el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Con fines comparativos los datos se expresaron en porcentajes de fijación (% fij.).

4.2. Desplazamiento de [³H]-CP55940 por W146 en las capas del cortex cerebral

Dado que se observó que ligandos de $S1P_1$ eran capaces de desplazar a [³H]-CP55940 en membranas de corteza cerebral (Fig. 2), posteriormente se caracterizó anatómicamente este desplazamiento mediante autorradiografías en secciones de tejido cerebral. El desplazante escogido para este experimento fue W146 dado que su afinidad por los sitios de unión del [³H]-CP55940 era mayor que la de CYM5442 (Fig. 2), y consecuentemente cambios pequeños en la concentración del ligando frío llevan a diferencias significativas en la unión/señal. Analizando la corteza cerebral por capas, las diferencias en la eficacia de la inhibición eran mínimas, siendo la eficacia ligeramente inferior en regiones densas en CB_1 como las capas I, V y VI (Fig. 4). La potencia de la inhibición en las capas I, V y VI fue similar a la descrita en el ensayo con homogeneizados de membrana incluyendo todas las capas ($pK_i \approx 10$) (Fig. 2, Fig. 4). No obstante, la potencia del desplazamiento en las capas II-IV fue aproximadamente un orden de magnitud inferior al del resto de capas ($pK_i = 9,259$) (Fig. 4).

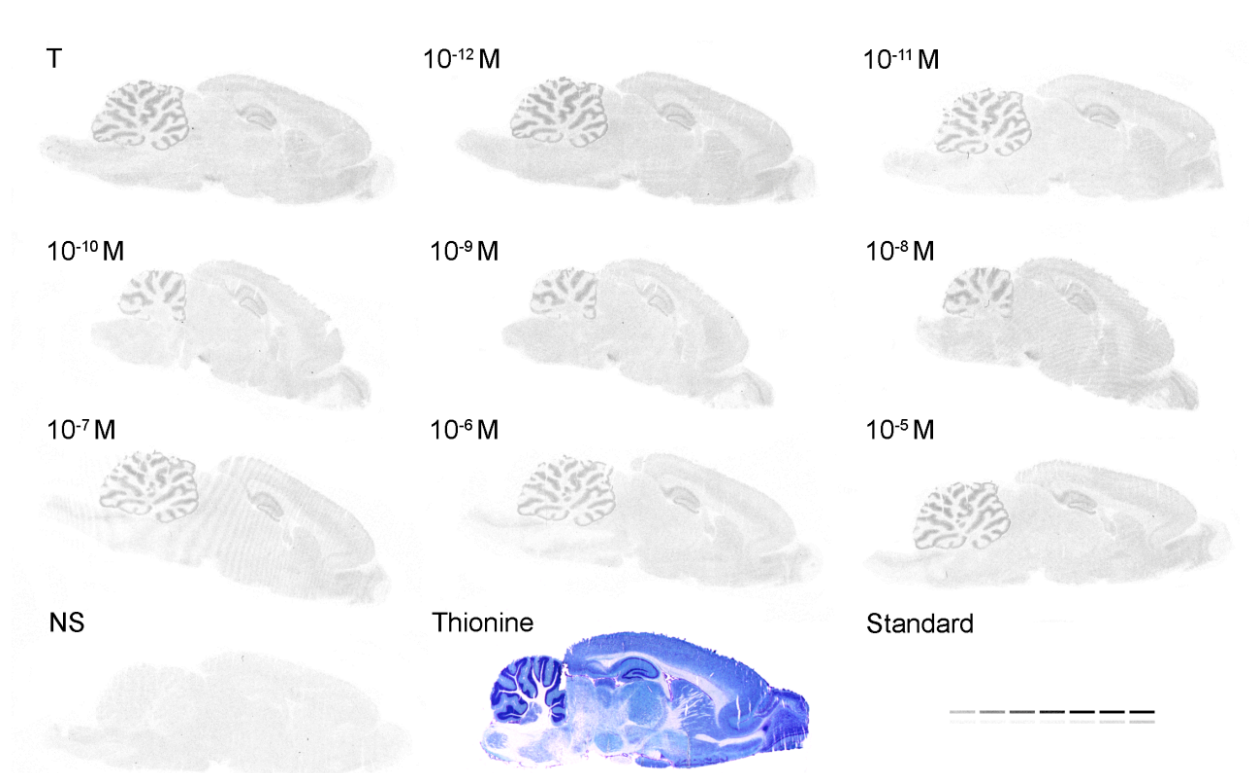


Figura 3. Autorradiograma de [³H]-CP55940 vs. W146. Secciones sagitales y consecutivas de cerebro de rata se incubaron con 3 nM de [³H]-CP55940 y concentraciones crecientes de W146 (10^{-12} M – 10^{-5} M). La unión total (T) se cuantificó en ausencia de W146 y la unión inespecífica (NS) se cuantificó a concentraciones saturantes (10^{-5} M) de CP55940. Las diferentes áreas cerebrales fueron identificadas con ayuda de una tinción de tionina y un atlas de cerebro de rata⁷⁴ y analizadas por separado con el *software* Fiji®^{70,71}. Los datos se normalizaron empleando un estándar de ³H y se ajustaron a un modelo de inhibición competitiva con un solo sitio de unión mediante el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

4.3. Desplazamiento de [³H]-CP55940 por W146 en otras áreas cerebrales

La autorradiografía se realizó con secciones completas de cerebro, por lo que también se analizó el desplazamiento en otras regiones representativas del cerebro. Concretamente, se analizaron áreas con densidades altas de CB₁ y en las que CB₁ y S1P₁ colocalizan^{66,67}. En dichas áreas CB₁ (sustancia gris del cerebelo, hipocampo y núcleo estriado) (Fig. 3), la eficacia de la inhibición fue considerablemente inferior a la registrada en regiones con densidad baja (cuerpo calloso) o media de CB₁ (tálamo) (Fig. 5). En general la potencia de la inhibición fue similar para casi todas las regiones cerebrales (Fig. 5) y es cuasi-idéntica a la determinada para la corteza cerebral (pK_i ≈ 10), tanto por ensayo de competición sobre membranas (Fig. 2) como por autorradiografía competitiva (Fig. 4). El hipotálamo y la sustancia blanca del cerebelo también fueron analizadas y los resultados apuntaban hacia potencias de pK_i = 9,886 y pK_i = 9,518 respectivamente (gráficos no mostrados), pero dada la elevada desviación estándar los datos no fueron concluyentes. El caso del tronco cerebral fue peculiar, ya que una región concreta del mismo correspondiente a proyecciones de la médula espinal presentaba menor fijación que la unión inespecífica (Fig. 3), por lo que la fijación adquiere valores negativos (Fig. 5). Curiosamente, los mayores porcentajes de inhibición (tronco, tálamo y cuerpo calloso) no se corresponden con las áreas cerebrales con mayores densidades de CB₁, como cabría esperar de una competición de ambos ligandos por los receptores CB₁.

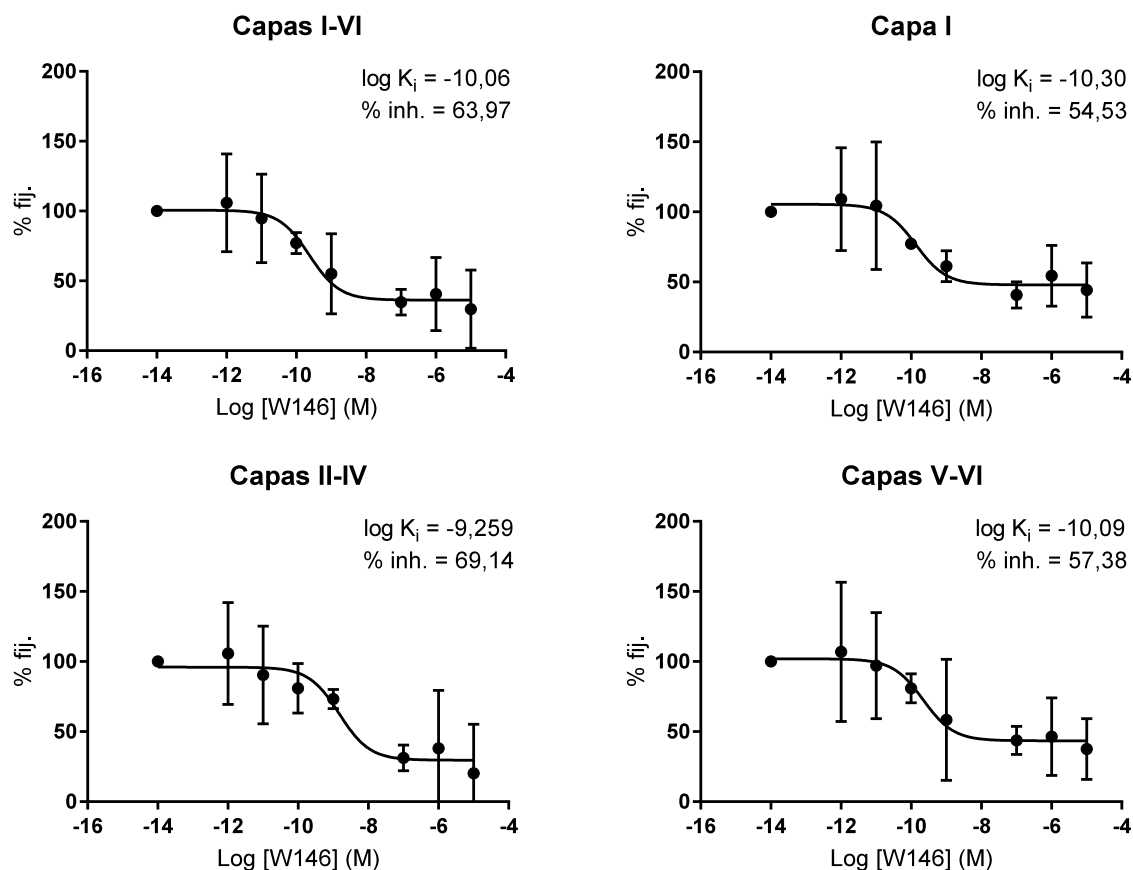


Figura 4. Curvas de desplazamiento de [³H]-CP55940 por W146 en las distintas capas de la corteza cerebral. Secciones sagitales de cerebro de rata se incubaron con 3 nM de [³H]-CP55940 y concentraciones crecientes de W146. Los datos se normalizaron empleando un estándar de ³H y se ajustaron a un modelo de inhibición competitiva con un solo sitio de unión mediante el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Con fines comparativos los datos se expresaron en porcentajes de fijación (% fij.).

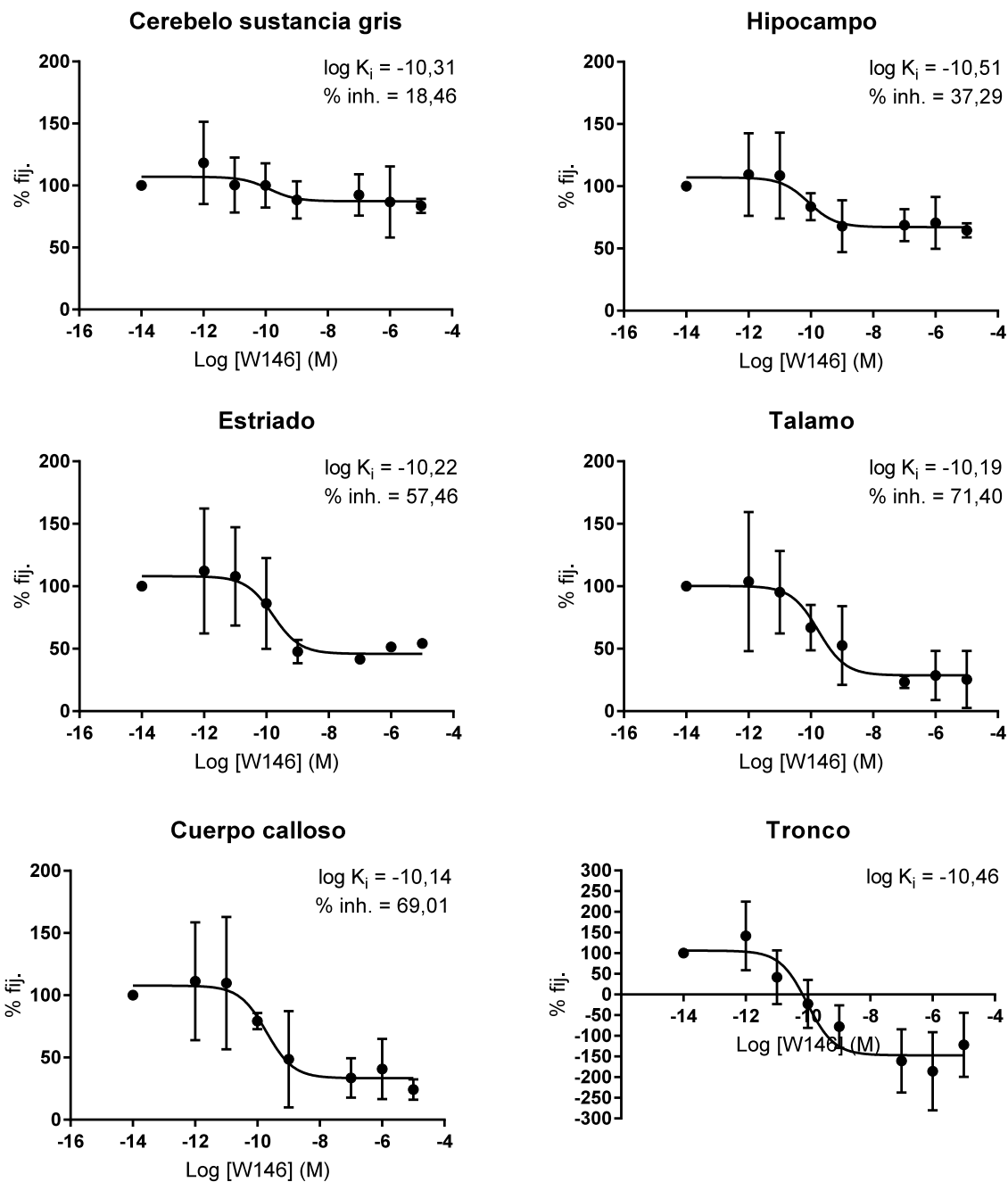


Figura 5. Curvas de desplazamiento de $[^3\text{H}]\text{-CP55940}$ por W146 en diferentes regiones del cerebro. Secciones sagitales de cerebro de rata se incubaron con 3 nM de $[^3\text{H}]\text{-CP55940}$ y concentraciones crecientes de W146. Los datos se normalizaron empleando un estándar de ^3H , se ajustaron a un modelo de inhibición competitiva con un solo sitio de unión mediante el *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Con fines comparativos los datos se expresaron en porcentajes de fijación (% fij.).

5. Discusión

Mediante un ensayo de competición de radioligandos en homogeneizados de corteza cerebral y una autorradiografía competitiva, empleando en ambos casos [³H]-CP55940, hemos determinado que ligandos con afinidad nanomolar por S1P₁ son capaces de desplazar al agonista [³H]-CP55940 en cerebro de rata, y que este desplazamiento presenta, en general, potencias similares tanto en regiones en las que abunda CB₁ como aquellas en las que no. Una excepción parecen ser las capas II-IV de la corteza cerebral, en las que la potencia de la inhibición es aproximadamente un orden de magnitud menor que en el resto de áreas. Curiosamente, en lo que concierne a la eficacia de la inhibición, la eficacia es mayor en regiones con baja densidad de CB₁. Estudios previos describieron que la esfingosina, el metabolito precursor de la S1P, y su análogo el pro-agonista de receptores S1P fingolimod (FTY720), en membranas de células CHO y HEK (que expresaban CB₁ de ratón o de humano respectivamente) eran antagonistas totales de CB₁ (pero no de CB₂) y competían por el sitio de unión del agonista [³H]-CP55940 ($pK_{i(S)} = 5,51$; $pK_{i(FTY720)} = 5,84$) y del antagonista [³H]-SR141716A ($pK_{i(S)} = 6,46$; $pK_{i(FTY720)} = 6,17$)⁷². Las formas fosforiladas de estos compuestos (P-FTY720 y S1P), que son agonistas de receptores para S1P, no son capaces de desplazar a agonistas CB₁, pero sí son capaces de competir con potencia baja por un subconjunto de sitios de unión de antagonistas CB₁ como el SR141716A ($pK_{i(S1P)} = 5,37$)⁷². Curiosamente, aunque en un principio S1P no compite por los sitios de [³H]-CP55940 en membranas de células transfectadas con CB₁, sí es capaz de competir con baja afinidad por estos sitios en cerebelo⁷². Esto realza la relevancia de estudios tisulares frente al estudio de receptores expresados en células transfectadas, en las cuales el antagonismo CB₁ tiende a ser puro⁷², posiblemente debido a una homogeneidad en el *pool* de receptores y a diferencias con las condiciones fisiológicas reales.

Siguiendo con esta línea de trabajo, hemos determinado que en membranas de corteza cerebral de rata el agonista de S1P₁, CYM5442, y el antagonista de S1P₁, W146, son capaces de desplazar parcialmente a [³H]-CP55940 ($pK_{i(CYM5442)} = 4,9$; $pK_{i(W146)} = 8,8$) (Fig. 2). La capacidad, aunque con potencia baja, de CYM5442 para desplazar a [³H]-CP55940 contrasta con la incapacidad para desplazar a [³H]-CP55940 previamente descrita de otros agonistas S1P₁, como el propio S1P⁷². No obstante, el antagonista de S1P₁, W146, sí desplaza con una potencia elevada a [³H]-CP55940. Es posible que CYM5442 y W146 desplacen al [³H]-CP55940 unido a CB₁. Sería interesante realizar un ensayo de radioligandos funcional empleando el análogo no-hidrolizable del GTP [³⁵S]-GTPγS para determinar si la actividad GPCR estimulada por CP55940 es no-aditiva con la actividad estimulada por CYM5442 o W146, lo cual sería indicativo de su posible actividad sobre CB₁. En cualquier caso, estos resultados apoyan la hipótesis de que los sistemas eCB y S1P interactúan en el cerebro.

Ha de señalarse que ni CYM5442 ni W146 inhibían por completo la unión de [³H]-CP55940, lo cual contrasta con la inhibición total ejercida por SR141716A (Fig. 2). Esto sugiere la existencia de más de un conjunto de sitios de unión de [³H]-CP55940. Una posible explicación a este fenómeno es que [³H]-CP55940 se una tanto a receptores cannabinoides como a S1P₁, y que los ligandos S1P₁ desplacen únicamente al [³H]-CP55940 unido a S1P₁. Esta hipótesis se ve apoyada por las diferencias en potencia de inhibición entre las distintas capas de la corteza cerebral. Las capas II-IV presentan una menor densidad de CB₁ respecto al resto de capas, mientras que S1P₁ presenta una expresión más o menos homogénea a lo largo de la corteza^{66,67}. Que un menor ratio CB₁/S1P₁ esté asociada a una menor potencia de inhibición sugiere que [³H]-CP55940 se une a S1P₁.

La unión de agonistas y antagonistas CB₁ a receptores de S1P también ha sido estudiada, pero hasta la fecha no existen evidencias convincentes de que estos ligandos se unan a estos receptores. Por ejemplo, un estudio autorradiográfico empleando [³⁵S]-GTPγS encontró que SR141716A era capaz de desplazar S1P en algunas regiones del cerebro (como el caudado putamen o la sustancia nigra), en las que los efectos de la estimulación por agonistas de CB₁ y agonistas de receptores S1P no eran aditivos (indicativo de que existe una interacción entre ambos sistemas)⁷³. Sin embargo, empleando ratones *knock-down* de CB₁ y S1P₁, este desplazamiento se atribuyó a una competición sobre CB₁ en lugar de sobre receptores S1P⁷³. Por contraposición, en nuestro estudio, la inexistencia de una correspondencia entre áreas de

mayor densidad de CB₁ y mayor eficacia de inhibición (tal y como cabría esperar) (Fig. 3, Fig. 5) vuelve a postular la posibilidad de que sea la molécula de [³H]-CP55940 la que tenga afinidad por receptores S1P₁, y no a la inversa, por lo que las regiones con mayor eficacia de inhibición se corresponderían con áreas de mayor densidad de S1P₁. Efectivamente, este parece ser el caso, ya que es en áreas ricas en S1P₁ del cerebro (como la corteza, el tronco o el tálamo) donde se observa de manera más consistente la competición de ambos ligandos (Fig. 5). Aunque todos estos resultados sugieran una unión de [³H]-CP55940 a S1P₁, esta debe de ser verificada en un futuro, por ejemplo utilizando ligandos tritiados de S1P₁ y tratando de desplazar estos con CP55940 no marcado.

Si [³H]-CP55940 no se une a S1P₁, explicaciones alternativas a la inhibición parcial observada en los ensayos de competición incluyen la presencia de otros receptores de eCB en el SNC^{3,14,15} o la existencia de subpoblaciones de CB₁, por ejemplo debido a distintos patrones de oligomerización⁷⁵. Aunque nuestro grupo no ensayó la competición de CYM5442 y W146 por los sitios de unión de CB₂, FTY720 y la esfingosina no se unen a CB₂⁷². Así, una interacción a nivel de ligandos entre los sistemas eCB y S1P parece ser exclusiva de aquellos tejidos que expresan CB₁, como el SNC.

Tanto en nuestro estudio autorradiográfico como en otros⁷³, se observa que, a pesar de que en homogeneizados un radioligando compita con otro ligando por la unión a CB₁ (Fig. 2), en cortes de tejido existen diferencias anatómicas en la eficacia y potencia del ligando frío para competir por el sitio de unión del radioligando (Fig. 5). Estas diferencias en grado de inhibición o pK_i pueden atribuirse a la existencia de poblaciones distintas de receptores CB₁, y se ha postulado que las distintas poblaciones de CB₁ se podrían corresponder a distintas formas oligoméricas de CB₁⁷⁶. Está descrito que los GPCRs son capaces de oligomerizar (típicamente formando dímeros) en etapas tempranas de su biogénesis, siendo transportados a la membrana en su forma dimérica⁷⁷. En el caso concreto de CB₁ se postuló que *in vivo* se encuentra en forma dimérica, siendo la interfaz de interacción su región C-terminal⁷⁸. Aunque la oligomerización mejor descrita de CB₁ sea una homodimerización, hay constancia de la existencia de heterodímeros de CB₁ (o incluso heterotrímeros⁷⁹) con diversos GPCRs, por ejemplo con CB₂⁸⁰, el receptor de dopamina D2⁸¹ o receptores opioides⁸². La heterodimerización de receptores típicamente provoca cambios alostéricos en ambos receptores, lo cual se traduce en cambios farmacológicos del receptor⁸²⁻⁸⁴. Por ejemplo, se ha descrito que la heterodimerización de GPCRs puede modular la afinidad del receptor por distintas proteínas G^{81,83,84}. Al igual que CB₁, se sabe que los receptores de S1P también pueden heterodimerizar, tanto con distintos subtipos de receptores de S1P⁸⁵ como con otros tipos de receptores⁸⁶. Además, S1P₁ es capaz de formar complejos con multitud de otros receptores de membrana, entre ellos receptores tirosina quinasa (TKR)⁸⁷. Dada la colocalización de CB₁ y receptores de S1P en las mismas células^{66,67}, así como potencialmente en las mismas balsas lipídicas^{88,89}, es posible que CB₁ y receptores S1P heterodimericen. La diversidad en receptores S1P podría formar al menos 5 tipos de heterodímero CB₁/receptor S1P distintos, cada uno con una distribución característica, acorde a la distribución del subtipo de receptor S1P que lo forma. Esto podría explicar distintas afinidades por el mismo ligando en distintas regiones del cerebro (tal y como se aprecia en las autorradiografías), así como la diversidad documentada en formas de señalización de receptores CB₁ y receptores S1P^{60,90}.

El sistema eCB y sistema S1P se desensibilizan por exposición prolongada a agonistas^{8,91}. La desensibilización del sistema eCB ha sido caracterizada en el SNC, tratándose de un mecanismo similar al del resto de GPCRs, y siendo parcialmente dependiente de endocitosis del receptor⁸. El caso del sistema S1P parece ser más complejo: se ha descrito que agonistas potentes de receptores S1P como el fingolimod (FTY720) en su forma fosforilada y activa (P-FTY720) desensibilizan el sistema S1P ejerciendo un antagonismo funcional⁹². No obstante, recientemente se ha puesto en cuestión cómo podrían estos agonistas potentes de receptores S1P provocar dicha desensibilización, dado que se ha demostrado que el reclutamiento típico de β-arrestinas y una subsecuente endocitosis del receptor en respuesta a una sobreestimulación de S1P₁, en determinadas situaciones en lugar de terminar la señalización del receptor puede potenciarla (debido a un efecto sinérgico entre receptores)⁸⁷, teniendo un efecto opuesto que en el caso de la endocitosis del CB₁⁸. Si CB₁ y S1P₁ colocalizan en los mismos dominios lipídicos^{88,89}, y una internalización de estos dominios provoca la desensibilización de CB₁ pero no de S1P₁, la endocitosis provocada por sobreexposición a agonistas de uno de los dos sistemas

favorecería la señalización del sistema S1P sobre la del sistema eCB. Aunque la potenciación de la señalización S1P₁ en endosomas respecto a cuando se ubica en la membrana plasmática se ha descrito en conjunción con otros receptores formando complejos⁸⁷, no se ha documentado estudiando la desensibilización de receptores S1P aislados⁹¹. Algunos estudios apuntan a que la dimerización de receptores puede influir en su patrón de fosforilación y en la subsecuente unión de β-arrestina^{77,93,94}, por lo que cabe la posibilidad de que esta desensibilización anómala de S1P₁ se deba a la interacción con otros receptores, lo cual abre la puerta a que una hipotética heterodimerización S1P₁-CB₁ influya en la desensibilización de los sistemas. Acorde a lo descrito previamente, en situaciones en las que S1P₁ forma complejos con determinados receptores la desensibilización del sistema no se da por endocitosis⁸⁷. La activación de S1P₁ también aumenta la actividad de SphK1, aumentando la concentración de S1P intracelular⁹⁵. Este S1P intracelular es moderadamente hidrosoluble y actúa como segundo mensajero sobre multitud de dianas⁹⁶, entre otros movilizándolo Ca²⁺ mediante mecanismos independientes de G_q/PLC⁴⁵. A su vez, este S1P incluso puede ser exportado para actuar de forma autocrina/paracrina sobre receptores de S1P⁹⁷. Es posible que este mecanismo provoque tanto la desensibilización de S1P₁ aislados mediante una endocitosis convencional por exposición crónica al agonista endógeno S1P, como la desensibilización de complejos de receptores con S1P₁, por ejemplo por agotamiento de esfingosina, el precursor del S1P.

Cabe destacar que recientemente se ha descrito un nuevo rol de la SphK1 en las primeras etapas de formación de vesículas endocíticas. SphK1 presenta en su superficie un parche hidrofóbico sensible a la curvatura de membranas lipídicas cargadas negativamente, por lo que tiende a localizarse en endosomas y terminales sinápticos⁹⁸. La desestabilización de dominios colesterol-esfingomielina aumenta la curvatura de membrana⁹⁸. Dado que la activación de CB₁ lleva a un incremento en la síntesis de ceramida por acción de esfingomielinasas⁶⁸, la activación del sistema eCB podría desestabilizar los dominios colesterol-esfingomielina, facilitando la síntesis de S1P por reclutamiento de SphK1 a la membrana y la subsecuente endocitosis de la balsa lipídica.

Todos estos datos sugieren un modelo en el cual el sistema eCB actúa como interruptor del sistema S1P. Una activación de CB₁ aumenta la actividad de esfingomielinasas y ceramidinasas⁶⁸, lo cual lleva a una disminución en los niveles de esfingomielinas (y la subsecuente desestabilización de dominios lipídicos⁹⁸), un aumento en los niveles de ceramida y un aumento en los niveles de esfingosina. Dado que la esfingosina es un antagonista de CB₁⁷², el sistema eCB es inhibido cierto tiempo tras su activación por acción autocrina de la esfingosina producida⁹⁷. Adicionalmente, parte de la esfingosina puede convertirse en S1P, lo cual retroalimenta la producción de S1P⁹⁵, de modo que una activación mínima de CB₁ puede provocar una respuesta S1P importante, que finalmente desemboca en la endocitosis de ambos sistemas, favorecida tanto por la desestabilización de los dominios lipídicos como por la traslocación de SphK1 a estas regiones⁹⁸. No obstante, si CB₁ y S1P₁ colocalizan y/o heterodimerizan en dominios lipídicos concretos, la función de S1P₁ tras la endocitosis puede no verse inhibida sino modificada. Así, una activación de CB₁ daría lugar, tras cierto tiempo, a la desensibilización del sistema eCB y a la activación del sistema S1P sin necesidad de agonistas exógenos de S1P₁. Este podría ser un mecanismo adicional para explicar la desensibilización del sistema CB₁.

Asumiendo que este modelo es al menos en parte correcto, se plantea la relevancia fisiológica de una activación secuencial de CB₁ y S1P₁. A nivel del SNC, una de las funciones más relevantes de CB₁ es inhibir de forma retrógrada la liberación de neurotransmisores⁹⁰. Aunque las funciones de los receptores S1P₁ son más diversas⁶⁰, una de las funciones emergentes que se le atribuye es regular el funcionamiento de los complejos proteicos que median la liberación de vesículas sinápticas^{54,55}. Consecuentemente postulamos que, en neuronas, la activación en segunda instancia del sistema S1P es un mecanismo de regulación que busca recuperar la situación fisiológica de neurotransmisión tras una inhibición de la misma por cannabinoides.

6. Referencias

1. Basavarajappa, B. S. Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity. *Curr. Neuropharmacol.* **5**, 81–97 (2007).
2. Mechoulam, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90 (1995).
3. Yang, H., Zhou, J. & Lehmann, C. GPR55 - A putative 'type 3' cannabinoid receptor in inflammation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **27**, 297–302 (2016).
4. Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, R. M., Melvin, S. & Howlett, C. Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, 605–613 (1988).
5. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
6. Herkenham, M. *et al.* Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* **11**, 563–583 (1991).
7. Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M. ., Mackie, K. & Walker, J. . Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* **83**, 393–411 (1998).
8. Sim-Selley, L. J. Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit. Rev. Neurobiol.* **15**, 91–119 (2003).
9. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).
10. Galiegue, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* **232**, 54–61 (1995).
11. Westlake, T. M., Howlett, A. C., Bonner, T. I., Matsuda, L. A. & Herkenham, M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: An in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* **63**, 637–652 (1994).
12. Katona, I. *et al.* Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **19**, 4544–4558 (1999).
13. Katona, I. *et al.* Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J. Neurosci.* **21**, 9506–9518 (2001).
14. Gong, J. P. *et al.* Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* **1071**, 10–23 (2006).
15. Onaivi, E. S. *et al.* Functional Expression of Brain Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors Are Involved in the Effects of Drugs of Abuse and in Depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1139**, 434–449 (2008).
16. Xi, Z.-X. *et al.* Brain Cannabinoid CB2 Receptors Modulate Cocaine's Actions in Mice. **14**, 1160–1166 (2012).
17. Childers, S. R. Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J.* **8**, E112-7 (2006).
18. Glass, M. & Felder, C. C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.* **17**, 5327–5333 (1997).
19. Rhee, M. H., Bayewitch, M., Avidor-Reiss, T., Levy, R. & Vogel, Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J. Neurochem.* **71**, 1525–1534 (1998).
20. Paquette, J. J., Wang, H.-Y., Bakshi, K. & Olmstead, M. C. Cannabinoid-induced tolerance is associated with a CB1 receptor G protein coupling switch that is prevented by ultra-low dose rimonabant. *Behav. Pharmacol.* **18**, 767–76 (2007).
21. Chen, X. *et al.* Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G_s and G_i. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1817–1834 (2010).
22. Lauckner, J. E., Hille, B. & Mackie, K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 19144–19149 (2005).
23. Bouaboula, M. *et al.* A Selective Inverse Agonist for Central Cannabinoid Receptor Inhibits Mitogen-activated Protein Kinase Activation Stimulated by Insulin or Insulin-like Growth Factor 1. *J. Biol. Chem.* **272**, 22330–22339 (1997).
24. Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gómez del Pulgar, T., Velasco, G. & Guzmán, M. Mechanism of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by the CB1 Cannabinoid Receptor. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1385–1392 (2002).
25. Guo, J. & Ikeda, S. R. Endocannabinoids Modulate N-Type Calcium Channels and G-Protein-Coupled

- Inwardly Rectifying Potassium Channels via CB1 Cannabinoid Receptors Heterologously Expressed in Mammalian Neurons. *Mol. Pharmacol.* **65**, 665–674 (2004).
26. Endoh, T. Pharmacological characterization of inhibitory effects of postsynaptic opioid and cannabinoid receptors on calcium currents in neonatal rat nucleus tractus solitarius. *Br. J. Pharmacol.* **147**, 391–401 (2006).
 27. Di Marzo, V. *et al.* Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691 (1994).
 28. Cadas, H., di Tomaso, E. & Piomelli, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 1226–42 (1997).
 29. Breivogel, C. S., Walker, J. M., Huang, S. M., Roy, M. B. & Childers, S. R. Cannabinoid signaling in rat cerebellar granule cells: G-protein activation, inhibition of glutamate release and endogenous cannabinoids. *Neuropharmacology* **47**, 81–91 (2004).
 30. Engler, B., Freiman, I., Urbanski, M. & Szabo, B. Effects of exogenous and endogenous cannabinoids on GABAergic neurotransmission between the caudate-putamen and the globus pallidus in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 608–17 (2006).
 31. Gifford, A. N. & Ashby, C. R. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1431–1436 (1996).
 32. Jennings, E. A., Vaughan, C. W., Roberts, L. A. & Christie, M. J. The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J. Physiol.* **548**, 121–129 (2003).
 33. Nakazi, M., Bauer, U., Nickel, T., Kathmann, M. & Schlicker, E. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **361**, 19–24 (2000).
 34. Cadogan, A. K., Alexander, S. P., Boyd, E. A. & Kendall, D. A. Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum. *J. Neurochem.* **69**, 1131–1137 (1997).
 35. Ishac, E. J. *et al.* Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2023–8 (1996).
 36. Buehrer, B. M. & Bell, R. M. Sphingosine kinase: properties and cellular functions. *Adv. Lipid Res.* **26**, 59–67 (1993).
 37. Mandala, S. M. Sphingosine-1-phosphate phosphatases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64**, 143–56 (2001).
 38. van Veldhoven, P. P. & Mannaerts, G. P. Sphingosine-phosphate lyase. *Adv. Lipid Res.* **26**, 69–98 (1993).
 39. Rosen, H., Stevens, R. C., Hanson, M., Roberts, E. & Oldstone, M. B. A. Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: Structure, Signaling, and Influence. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 637–662 (2013).
 40. Goetzl, E. J., Graeler, M., Huang, M. C. & Shankar, G. Lysophospholipid growth factors and their G protein-coupled receptors in immunity, coronary artery disease, and cancer. *ScientificWorldJournal* **2**, 324–338 (2002).
 41. Nishimura, H., Akiyama, T., Irei, I., Hamazaki, S. & Sadahira, Y. Cellular Localization of Sphingosine-1-phosphate Receptor 1 Expression in the Human Central Nervous System. *J. Histochem. Cytochem.* **58**, 847–856 (2010).
 42. Wang, C. *et al.* Systemic distribution, subcellular localization and differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors in benign and malignant human tissues. *Exp. Mol. Pathol.* **97**, 259–265 (2014).
 43. Im, D. S. *et al.* Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* **275**, 14281–14286 (2000).
 44. Terai, K. *et al.* Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience* **116**, 1053–1062 (2003).
 45. Mattie, M., Brooker, G. & Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 3181–3188 (1994).
 46. Olivera, A. & Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* **365**, 557–60 (1993).
 47. Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate: a prototype of a new class of second messengers. *J. Leukoc. Biol.* **65**, 341–344 (1999).
 48. Payne, S. G., Milstien, S. & Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate: Dual messenger functions. *FEBS Lett.* **531**, 54–57 (2002).
 49. Bode, C. & Gräler, M. H. Immune regulation by sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **60**, 3–12 (2012).

50. Levkau, B. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate (S1P). *Handb Exp Pharmacol.* **216**, 147-170 (2013)
51. Martin, R. & Sospedra, M. Sphingosine-1 phosphate and central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol.* **378**, 149-170 (2014)
52. Strohlic, L., Dwivedy, A., Horck, F. P. G. Van, Falk, J. & Christine, E. A role for S1P signalling in axon guidance in the *Xenopus* visual system. *Development.* **135**, 333-342 (2013).
53. Toman, R. E. *et al.* Differential transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors modulates NGF-induced neurite extension. *J. Cell Biol.* **166**, 381-392 (2004).
54. Sim-Selley, L. J. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptors mediate neuromodulatory functions in the CNS. *J. Neurochem.* **110**, 1191-1202 (2009).
55. Riganti, L. *et al.* Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Impacts Presynaptic Functions by Regulating Synapsin I Localization in the Presynaptic Compartment. *J. Neurosci.* **36**, 4624-4634 (2016).
56. Coelho, R. P., Saini, H. S. & Sato-Bigbee, C. Sphingosine-1-phosphate and oligodendrocytes: from cell development to the treatment of multiple sclerosis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **91**, 139-44 (2010).
57. Pébay, a *et al.* Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 2067-76 (2001).
58. Mullershausen, F. *et al.* Phosphorylated FTY720 promotes astrocyte migration through sphingosine-1-phosphate receptors. *J. Neurochem.* **102**, 1151-61 (2007).
59. Mendelson, K., Evans, T. & Hla, T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* **141**, 5-9 (2014).
60. Ghasemi, R., Dargahi, L. & Ahmadiani, A. Integrated sphingosine-1 phosphate signaling in the central nervous system: From physiological equilibrium to pathological damage. *Pharmacol. Res.* **104**, 156-164 (2016).
61. Pyne, S. & Pyne, N. Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **88**, 115-131 (2000).
62. Devane, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-9 (1992).
63. Lee, M.-J. *et al.* Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science.* **279**, 1552-1555 (1998).
64. Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J. A., Weiner, J. A. & Chun, J. Lysophospholipid receptors. *Neuroscience* (2001).
65. Kostenis, E. Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: New receptors for 'old' ligands. *J. Cell. Biochem.* **92**, 923-936 (2004).
66. Sim, L. J., Hampson, R. E., Deadwyler, S. A. & Childers, S. R. Effects of chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol on cannabinoid-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* **16**, 8057-8066 (1996).
67. Waeber, C. & Chiu, M. L. In Vitro Autoradiographic Visualization of Guanosine-5'-O-(3-[35S]Thio) triphosphate Binding Stimulated by Sphingosine 1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid. *J Neurochem.* **73**, 1212-1221 (1999).
68. Guzmán, M., Galve-Roperh, I. & Sánchez, C. Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 19-22 (2001).
69. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
70. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676-82 (2012).
71. Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. & Eliceiri, K. W. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* **82**, 518-529 (2015).
72. Paugh, S. W. *et al.* Sphingosine and Its Analog , the Immunosuppressant Interact with the CB 1 Cannabinoid Receptor. *Mol. Pharmacol.* **70**, 41-50 (2006).
73. Collier, L. M. Relationship between CB1 and S1P receptors in the central nervous system. (Virginia Commonwealth University, 2006).
74. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* (Academic Press, 2013).
75. Smith, T. H., Sim-Selley, L. J. & Selley, D. E. Cannabinoid CB 1 receptor-interacting proteins: Novel targets for central nervous system drug discovery? *Br. J. Pharmacol.* **160**, 454-466 (2010).
76. Rozenfeld, R. *et al.* Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons. *PLoS One* **7**, e29239 (2012).
77. Terrillon, S. & Bouvier, M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* **5**, 30-34 (2004).
78. Wager-Miller, J., Westenbroek, R. & Mackie, K. Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem. Phys. Lipids* **121**, 83-89 (2002).

79. Navarro, G. *et al.* Detection of Heteromers Formed by Cannabinoid CB₁, Dopamine D₂, and Adenosine A_{2A} G-Protein-Coupled Receptors by Combining Bimolecular Fluorescence Complementation and Bioluminescence Energy Transfer. *Sci. World J.* **8**, 1088–1097 (2008).
80. Callén, L. *et al.* Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J. Biol. Chem.* **287**, 20851–20865 (2012).
81. Kearn, C. S. Concurrent Stimulation of Cannabinoid CB1 and Dopamine D2 Receptors Enhances Heterodimer Formation: A Mechanism for Receptor Cross-Talk? *Mol. Pharmacol.* **67**, 1697–1704 (2005).
82. Bushlin, I., Gupta, A., Stockton, S. D., Miller, L. K. & Devi, L. A. Dimerization with Cannabinoid Receptors Allosterically Modulates Delta Opioid Receptor Activity during Neuropathic Pain. *PLoS One* **7**, e49789 (2012).
83. Maggio, R., Novi, F., Scarselli, M. & Corsini, G. U. The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology. *FEBS J.* **272**, 2939–2946 (2005).
84. Hudson, B. D., He, T. E. & Kelly, M. E. M. Ligand- and Heterodimer-Directed Signaling of the CB1 Cannabinoid Receptor. *Mol Pharmacol.* **77**, 1–9 (2010).
85. Van Brocklyn, J. R., Behbahani, B. & Lee, N. H. Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1582**, 89–93 (2002).
86. Rahaman, M., Costello, R. W., Belmonte, K. E., Gendy, S. S. & Walsh, M. T. Neutrophil sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors in pneumonia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 233–241 (2006).
87. Pyne, N. & Pyne, S. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Signaling in Mammalian Cells. *Molecules* **22**, 344 (2017).
88. Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Finazzi-Agrò, A. & Maccarrone, M. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells: Implications for anandamide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 12212–12220 (2005).
89. Ryu, J. M. *et al.* Sphingosine-1-phosphate-induced Flk-1 transactivation stimulates mouse embryonic stem cell proliferation through S1P1/S1P3-dependent β -arrestin/c-Src pathways. *Stem Cell Res.* **12**, 69–85 (2014).
90. Kendall, D. A. & Yudowski, G. A. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System: Their Signaling and Roles in Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 1–10 (2017).
91. Reeves, P. M., Kang, Y. L. & Kirchhausen, T. Endocytosis of Ligand-Activated Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Mediated by the Clathrin-Pathway. *Traffic* **17**, 40–52 (2016).
92. Brinkmann, V. *et al.* Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 883–897 (2010).
93. Pfeiffer, M. *et al.* Heterodimerization of Substance P and mu-Opioid Receptors Regulates Receptor Trafficking and Resensitization. *J. Biol. Chem.* **278**, 51630–51637 (2003).
94. Stanasila, L., Perez, J. B., Vogel, H. & Cotecchia, S. Oligomerization of the α 1a- and α 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* **278**, 40239–40251 (2003).
95. Meyer zu Heringdorf, D. *et al.* Stimulation of intracellular sphingosine-1-phosphate production by G-protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **414**, 145–154 (2001).
96. Strub, G. M., Maceyka, M., Hait, N. C., Milstien, S. & Spiegel, S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 141–155 (2010).
97. Blom, T. *et al.* An autocrine sphingosine-1-phosphate signaling loop enhances NF- κ B-activation and survival. *BMC Cell Biol.* **11**, 45 (2010).
98. Shen, H. *et al.* Coupling between endocytosis and sphingosine kinase 1 recruitment. *Nat. Cell Biol.* **16**, 652–662 (2014).