

Regulació transcripcional dels receptors d'adenosina en les malalties neurodegeneratives

Sandra Pérez Buira

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Medicina

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

***REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DELS RECEPTORS
D'ADENOSINA EN LES MALALTIES NEURODEGENERATIVES***

Sandra Pérez Buira

Directora de tesi: Dra. Marta Barrachina

Codirector de tesi: Dr. Isidre Ferrer

Desembre 2009



Facultat de Medicina

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Memòria presentada per la Sandra Pérez Buiria per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona.

La tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Marta Barrachina Castillo i el Dr. Isidre Ferrer Abizanda en el departament de Patologia i Terapèutica Experimental de la Universitat de Barcelona.

Directora de tesi
Dra. Marta Barrachina Castillo

Codirector de tes
Dr. Isidre Ferrer Abizanda

Desembre 2009

*Als meus pares,
que sempre han estat al meu costat
de forma incondicional*

Agraïments

En primer lloc agrair tant a l'Isidre Ferrer com a la Marta Barrachina l'oportunitat de poder realitzar la tesi i per transmetre'm la seva il·lusió per aquesta feina. A l'Isidre pel seu bon humor, el seu esperit crític i els seus consells. A la Marta Barrachina per la seva infinita paciència: ha estat un viatge intens i ple d'aventures tant a nivell personal com a nivell professional i al final, hem aconseguit un tàndem magnífic, moltes gràcies!! Als meus companys de laboratori l'Esther, el Gabriel, l'Anna, el Gerard, la Janu, l'Anna G., la Laia i el Guido que s'han convertit en amics després de quatre anys de compartir plegats alegries i tristeses: em sento molt orgullosa d'haver compartit amb vosaltres aquesta etapa de la meva vida. La Marga i la Rosi o la Rosi i la Marga que han impregnat de caràcter aquest laboratori omplint de llum i color el nostre dia a dia. A l'Esther i la Berta per la seva acollida al grup. A la Núria, al Salva i la Loli per la seva ajuda en tans moments i, en especial, al Jesús per la seva paciència infinita i el seu bon humor. A la Susanna que no ha tingut mai un no alhora d'ajudar-me. A la Beatrice, que ha estat una inoblidable companya de laboratori i amiga: gràcies pels teus savis consells i pels teus somriures que il·luminen cada matí el laboratori. A la Gema, l'Esther, l'Anton i la Marta M., amb qui he coincidit poc però que la seva energia ha renovat el laboratori. A la Mairena Martín que, des de la distància, no es conscient de l'escalfor i confiança que ha enviat a través dels seus mails al miniequip que representàvem la Marta i jo.

Vull agrair especialment a l'Ester, la Gemma, l'Anna, la Ruth, la Maira, la Maria José, la Rebe, el Javi i el Juan que han passat de ser grans amics a una gran família. A l'Anna, el Fran i el Gorka per ser al meu costat de forma incondicional des de sempre. Al Jose per fer-me conèixer de què estan fets els somnis i al David que ha aparegut a la meva vida com una descàrrega i amb qui sóc més jo que mai. A la meva família: els meus avis, els meus tiets i els meus cosins... que sempre em recorden d'on vinc i em fan sentir acompanyada allà on vagi. I al meu germà, que és l'única persona en el món que treu de mi un somriure amb només una mirada.

Sandra Pérez Buira

I. Índex**II. Abreviacions****III. Introducció****1. ELS RECEPTORS D'ADENOSINA**

1.1. Estructura dels receptors acoblats proteïna G (GPCRs).....	4
1.2. Mecanismes de transducció de senyal dels receptors d'adenosina.....	6
1.3. Regulació dels GPCRs	
1.3.1. Desensibilització.....	7
1.3.2. Heterodimerització.....	8
1.4. El receptor A ₁	
1.4.1. Organització gènica.....	9
1.4.2. Funcionalitat.....	10
1.5. El receptor A _{2A}	
1.5.1. Organització gènica.....	10
1.5.2. Funcionalitat.....	11
1.6. Els receptors A _{2B} i A ₃	12

2. LES MALALTIES NEURODEGENERATIVES

2.1. Taupaties.....	15
2.1.1. La proteïna tau.....	16
2.1.2. El paper funcional de la Tau.....	17
2.1.3. La malaltia de grans argiròfils (AGD).....	18
2.1.3.1. Característiques neuropatològiques.....	19
2.1.3.2. Etiologia.....	20
2.1.3.3. Factors genètics.....	21
2.2. α -sinucleinopaties	
2.2.1. La proteïna α -sinucleïna.....	21
2.2.2. El paper funcional de l' α -sinucleïna.....	22
2.2.3. Classificació de les α -sinucleinopaties.....	23
2.2.4. La malaltia de Parkinson	
2.2.4.1. Característiques neuropatològiques.....	24
2.2.4.2. Factors genètics.....	25
2.2.4.3. Etiologia.....	26
2.2.4.4. Els ganglis basals i el moviment.....	26

2.2.4.5. Els ganglis basals i els receptors d'adenosina.....27
2.2.4.6. Teràpia.....29

3. REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

3.1. L'organització de la cromatina.....30
3.2. Epigenètica.....33
3.2.1. La modificació de les histones.....35
3.2.1.1. L'acetilació de les histones.....37
3.2.1.2. La metilació de les histones.....38
3.2.2. La metilació de l'ADN.....38
3.2.2.1. DNMT (ADN metiltransferases).....40
3.2.2.2. Proteïnes d'unió a l'ADN metilat40
3.2.3. Malalties neurodegeneratives i Epigenètica.....43
3.3. Els factors de transcripció.....44
3.3.1. ZBP-89.....45
3.3.1.1. El paper funcional del ZBP-89.....46
3.3.2. Yin Yang (YY1).....46
3.3.2.1. El paper funcional del YY1.....47

IV. Ojectius.....49

V. Resultats Publicats

1. Perez-Buira S., Barrachina M., Rodriguez A., Albasanz J.L., Martín M. and Ferrer I. (2007) **Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease.** *Neurosci. Lett.* 423, 194-199.....59
2. Albasanz, J.L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., Martín, M., 2008. **Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease.** *Brain Pathol.* 18, 211-219.....67
3. Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I and Barrachina M. **DNA methylation regulates adenosine A2A receptor cell surface expression levels.** *J Neurochem.*.....79

VI. Discussió	93
VII. Conclusions	107
VIII. Bibliografia	111
IX. Resultats Annexos	

<i>Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I and Barrachina M. Increased striatal Yin yang-1 levels in Parkinson's disease: a potential negative regulator of adenosine A_{2A} receptor expression levels</i>	139
---	-----

II. Abreviacions

A₁R, receptor d'adenosina A₁

A_{2A}R, receptor d'adenosina A_{2A}

A_{2B}R, receptor d'adenosina A_{2B}

A₃R, receptor d'adenosina A₃

AC, adenilat ciclasa

AD, malaltia d'Alzheimer

ADf, malaltia d'Alzheimer familiar

ADN, àcid desoxiribonucleic

ADP, adenosina-5'-difosfat

AGD, malaltia de grans argiròfils

AMP, adenosina-5'-monofosfat

AMPc, adenosin 3', 5' monofosfat cíclic

APP, proteïna precursora del pèptid β amiloide

ARN, àcid ribonucleic

ARNi, ARN d'interferència

ARNm, ARN missatger

ATP, adenosina-5'- trifosfat

BRET, Bioluminescence Resonance Energy Transfer o l'assaig de transferència d'energia per ressonància de bioluminiscència

CGI, illes CpG

CF, còrtex frontal

CJD, malaltia de Creutzfeldt-Jakob

CpG, dinucleòtids de citosina i guanina

CREB, proteïna d'unió a l'element de resposta de l'AMPc

CRE, element de resposta de l'AMPc

II. Abreviacions

Da, dalton

DCB, degeneració cortico-basal

DFT-17, demència frontotemporal amb mutació en el cromosoma 17

DLBc, demència de cossos de Lewy forma comuna

DLBp, demència de cossos de Lewy forma pura

DNMT, ADN metiltransferases

DS, síndrome de Down

DZ, bessons dizigòtics

ELA, esclerosi lateral amiotròfica

GABA, àcid γ -amino-butíric

GBA, glucocerebrossidasa

GDP, guanosina-5'-difosfat

GPCRs, receptors acoblats a proteïna G

GRK, cinasa de receptor associat a proteïna G

GTP, guanosina-5'-trifosfat

Gpe, element extern del globus pàl·lid

Gpi, element intern del globus pàl·lid

HD, malaltia de Huntington

HDAC, histona deacetilasa

HAT, histona acetiltransferasa

KDa, kilodalton

MA, malaltia d'Alzheimer

MAF, malaltia d'Alzheimer familiar

MAPT, gen que codifica per la proteïna tau

MBD, domini d'unió a grups metil

MBDP, proteïna amb dominis d'unió a grups metil

mGluR1, receptor metabotrópic de glutamat 1

MSA, atrofia multisistèmica

NST, nucli subtalàmic

NFT, cabdells de tau

NIFID, degeneració amb filaments intermedis neuronals;

MZ, bessons monozigòtics

P1, receptors purinèrgics de tipus 1

P2, receptors purinèrgics de tipus 2

PD, malaltia de Parkinson

PDf, malaltia de Parkinson familiar

PHF, parells de filaments helicoidals

PiD, malaltia de Pick

PKA, proteïna quinasa A

PLC, fosfolipasa C

PP2A, proteïna fosfatasa 2A

PSEN, gen que codifica per la presenilina

PSP, paràlisi supranuclear progressiva

SAH, s-adenosilhomocisteïna

SAM, s-adenosil metionina

SNC, sistema nerviós central

SNPr, substància nigra pars reticulata

SNPc, substància nigra pars compacta

STN, nucli subtalàmic

5'UTR o 3'UTR, regió 3' o 5' no transcrita

III.Introducció

1. ELS RECEPTORS D'ADENOSINA

L'adenosina és un nucleòsid de purina que juga un paper a gairebé tots els processos cel·lulars. Actua en forma de nucleòsid, de nucleòtid (amb l'extrem 5' fosforilat) o formant part de molècules més complexes. La seva funció intracel·lular es pot dividir en tres grans àrees: la transmissió d'informació genètica (ADN), el mecanisme de bescanvi energètic (ATP) i la participació en els mecanismes de transducció de senyal (AMPc). A nivell extracel·lular actua com a indicador del metabolisme energètic i juga un paper en l'activitat elèctrica de les neurones, la lipòlisis en els adipòcits o la contracció en els cardiomiòcits (Cunha, 2001).

En el sistema nerviós central (SNC) l'adenosina actua principalment com a regulador homeostàtic, funció comú per totes les cèl·lules incloses neurones i glia i com a neuromodulador, controlant la neurotransmissió i l'excitabilitat neuronal (Cunha, 2001).

En condicions normals, la concentració d'adenosina intracel·lular es troba entre 10-50nM (Cunha, 2001) i la concentració d'adenosina extracel·lular és aproximadament del rang de 25-250nM (Dunwiddie & Masino, 2001). La concentració intracel·lular està estretament lligada al metabolisme energètic i, petits canvis en la concentració d'ATP generen grans canvis en els nivells d'adenosina intracel·lular (Meghji et al., 1989). Tots els tipus cel·lulars presenten transportadors de nucleòtids bidireccionals i no concentratius, de manera que la concentració intracel·lular s'equilibra amb l'extracel·lular. El transport de l'adenosina extracel·lular cap a l'interior de la cèl·lula és a través de transportadors de nucleòtids concentratius (Baldwin et al., 2004). Si hi ha un increment de l'adenosina intracel·lular, aquest es trasllada a l'entorn de la cèl·lula activant els receptors d'adenosina de forma autocrina i paracrina.

En situacions d'estrès energètic com la hipòxia o la isquèmia, l'adenosina extracel·lular augmenta a causa del fort consum d'ATP per part de la cèl·lula (Newby et al., 1991; Latini & Pedata, 2001). L'adenosina tendeix a restablir el balanç energètic i per aquest motiu, s'ha considerat un neuroprotector endogen (Dunwiddie & Masino, 2001). Hi ha tres fonts d'adenosina extracel·lular: la sortida d'adenosina intracel·lular a través dels transportadors, com a conseqüència de l'activitat ecto-nucleotidasa i per l'acció dels enzims que degraden l'AMPc secretat (Zimmermann & Braun, 1996; Fredholm et al., 2005)(**Figura 1**).

III. Introducció

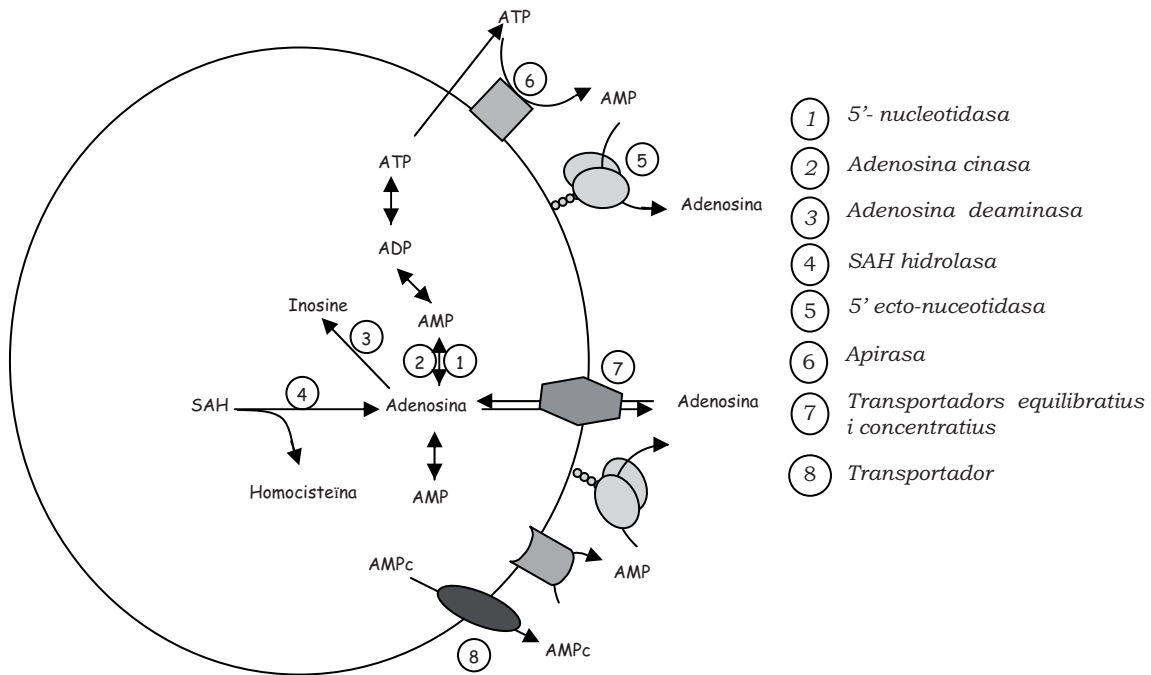


Figura 1. Vies de producció, metabolisme i transport d'adenosina. L'adenosina es pot formar a partir d'AMP, ATP (1) i de la S-adenosilhomocisteïna (SAH) per acció d'enzims intracel·lulars (4). L'adenosina pot convertir-se: en 5'AMP, a través de l'enzim adenosina cinasa(2); en inosina, per l'adenosina deaminasa (3) o passar a l'espai extracel·lular a través de diversos transportadors (7)(8). Un cop a l'espai extracel·lular ATP, AMP i AMPc es poden convertir en adenosina a través de la 5' ecto-nucleotidasa (5) i l'Apirasa (6). [Adaptat de l'article Latini,S. 2001]

1.1. Estructura dels receptors acoblats a proteïna G (GPCRs)

Els receptors d'adenosina formen part de la família de receptors purinèrgics. Aquests es classifiquen en: els P1, que responen a l'adenosina i els P2, que responen a l'ATP. L'adenosina és el principal lligant natural dels quatre receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3) que es troben distribuïts per tot l'organisme (Ralevic & Burnstock, 1998). Tradicionalment han estat classificats en funció de la seva capacitat d'estimular (A_{2A} i A_{2B}) o d'inhibir l'adenilat ciclase (A_1 i A_3)(**Taula 1**). Actualment, hi ha autors que qüestionen aquesta classificació ja que, s'ha demostrat que molts receptors tenen capacitat d'acoblar-se a diferents tipus de proteïna G i a diferents sistemes de transducció de senyals en funció del teixit. Per aquest motiu, l'autor proposa que aquests receptors presenten efectes pleiotròpics, és a dir, potencialment poden acoblar-se a

III. Introducció

diferents sistemes de transducció de senyal depenent del grau d'activació i de la localització subcel·lular (Cunha, 2005) .

Receptor	Proteïna G	Mecanisme de transducció	Afinitat
A ₁	Gi	Inhibeix AC Activa GIRKs	70nM
	Go	Inhibeix canals de Ca ⁺² Activa PLC	
A _{2A}	Gs	Activa AC Inhibeix canals de Ca ⁺²	150nM
	Golf		
A _{2B}	Gs	Activa AC Activa PLC	5100nM
	Gq / 11		
A ₃	Gi	Inhibeix AC Activa PLC	6500nM
	Gq / 11	Increment de Ca ⁺² intracel·lular	

Taula 1. [Adaptat de Fredholm, B.B. 2005]

Els receptors d'adenosina són receptors acoblats a la proteïna G (GPCRs) de la família A, és a dir, presenten una estructura similar a la de la rodopsina. Es caracteritzen perquè atravesen la membrana amb set dominis α -hèlix, on la regió N-terminal queda a l'espai extracel·lular i la C-terminal a l'espai intracel·lular. La regió extracel·lular interacciona amb el lligant i la intracel·lular, s'acopla a la proteïna G (són d'especial importància els bucles 2 i 3)(**Figura 2**).

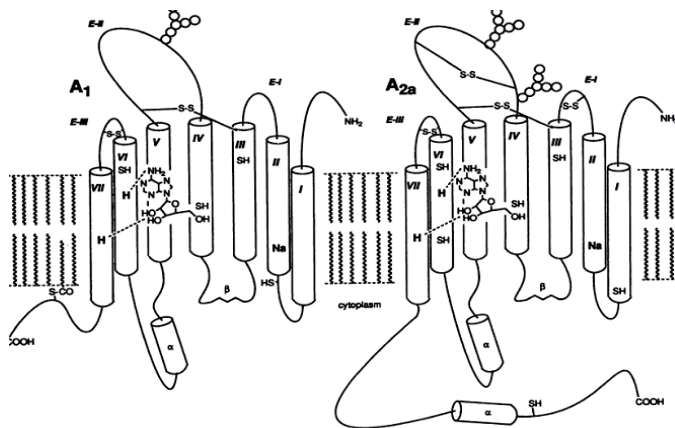


Figura 2. Els receptors d'adenosina són de tipus A. El receptor A_{2A} presenta un major nombre de glicosilacions i fosforilacions juntament amb una regió C-terminal més llarga que el receptor A₁ .

Les proteïnes G formen part de la família de les *proteïnes G heterotrimèriques*, formades per tres cadenes polipeptídiques diferents anomenades α , β i γ . El mecanisme d'acció és el següent (**Figura 3**):

III. Introducció

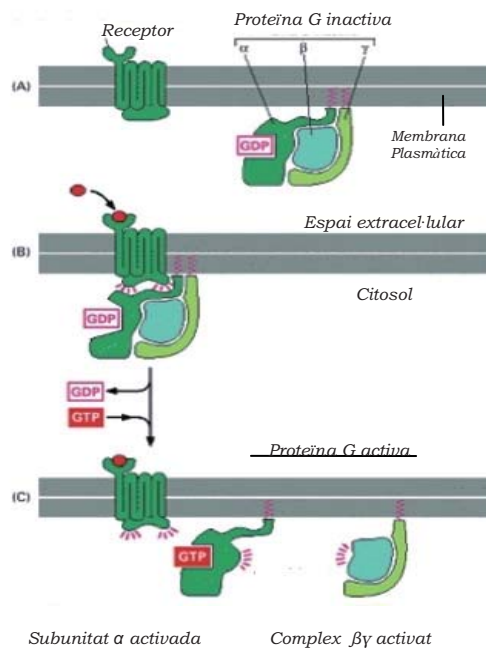


Figura 3. Mecanisme d'acció dels receptors de proteïna G.

La proteïna G inactivada està formada per les subunitats α , β i γ on, la subunitat α , està unida a una molècula de GDP(A). Al unir-se l'agonista al receptor, aquest, canvia de conformació, augmentant l'afinitat per la subunitat α de la proteïna G (B). En la interacció, α perd l'afinitat per GDP, unint-se al GTP. Aquesta molècula carregada d'energia, permet que la subunitat α es dissociï del dímer $\beta\gamma$. Cada subunitat (α i $\beta\gamma$) passa a activar les seves respectives molècules efectores (C). Aquest mecanisme actua com un interruptor molecular, que un cop encès, roman inactiu fins que la GTP s'hidrolitza i la subunitat α torna a augmentar l'afinitat pel dímer $\beta\gamma$.

Existeix una gran heterogeneïtat de subunitats: uns 16 subtipus de $G\alpha$, 5 subtipus de β i 14 de γ , que confereixen al sistema un alt grau de complexitat i capacitat d'amplificació (Milligan et al., 2006).

1.2. Mecanismes de transducció de senyal dels receptors d'adenosina

Com s'ha mencionat a l'apartat anterior, aquests receptors poden interaccionar amb diferents mecanismes de transducció de senyals. Clàssicament, el principal mecanisme emprat per aquests receptors ha estat la via de transducció de l' **adenilat ciclasa** (AC).

Les AC són una família d'enzims que catalitzen la formació d'AMP cíclic (AMPc), un segon missatger que es troba en totes les cèl·lules de l'organisme. S'han descrit nou subtipus d'ACs distribuïdes de forma diferenciada en funció

del teixit. Les AC tenen un pes molecular d'entre 120-130KDa i tenen dotze dominis transmembrana. L'*adenilat ciclase I* és la majoritària en el SNC.

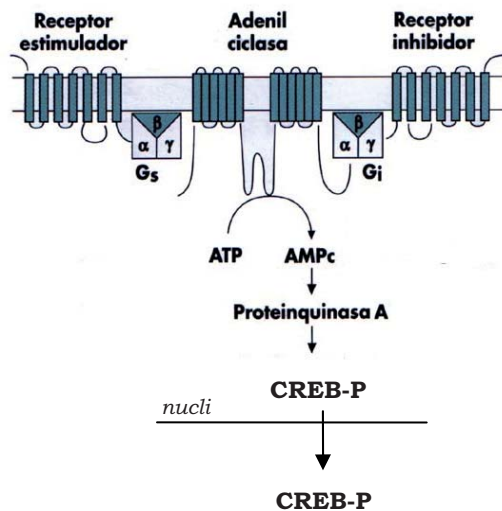


Figura 4. Mecanisme de transducció de senyal de l'adenilat ciclase

La subunitat α_i de les proteïnes G (G_{ai}), inhibeix l'activitat de l'AC i la subunitat G_{as} l'activa. L'AMPc té, entre molts altres substrats, la proteïna cinasa A (PKA). Aquesta cinasa, un cop activa, fosforila els residus serina o treonina dels substrats diana. La PKA fosforila la proteïna d'unió a l'element de resposta a AMPc o CREB, un factor de transcripció important en moltes funcions neurals. La fosforilació de CREB, permet que dimeritzi i es transloqui cap al nucli, promovent la

transcripció de gens amb elements de resposta a AMPc (CRE) en els seus promotors (**Figura 4**)(De Cesare et al., 1999).

1.3. Regulació dels GPCRs

1.3.1. Desensibilització

Les cèl·lules diana responen a les senyals que reben regulant el temps d'exposició dels receptors a la membrana, per tal d'evitar una sobrestimulació. Aquest procés s'anomena *adaptació o desensibilització*, i permet a la cèl·lula regular de forma reversible la sensibilitat a l'estímul durant períodes prolongats de temps. És un procés de retroalimentació negativa i es pot produir de dues formes:

Per **fosforilació**, promovent una inactivació ràpida dels receptors (en qüestió de minuts). Un cop el receptor està sobreexposat a un lligant, la *concentració de l'AMPc* augmenta activant cinases com la PKA, que fosforilen el receptor interferint en l'unió amb la proteïna G efectora.

Per altra banda, les cèl·lules adequen el nombre de receptors que mantenen a la membrana, mitjançant el procés d'**internalització**. Aquest

III. Introducció

procés permet desacoblar el receptor de la seva proteïna G efectora, descarregant el seu lligant en endosomes que retarden la seva reparició a la membrana. De forma independentment a la concentració de l'AMPc les cinases acoblades a GPCR, les GRK, fosforilen al receptor. Sobre aquests residus fosforilats, és on s'uneix una proteïna anomenada β -arrestina que bloqueja l'activitat del receptor per activar la proteïna G. La β -arrestina recluta a la clatrina promovent l'endocitosi (**Figura 5**) (Pierce & Lefkowitz, 2001). Un cop internalitzat, els GPCRs són defosforilats i retornen a la membrana o s'eliminen a través dels lisosomes.

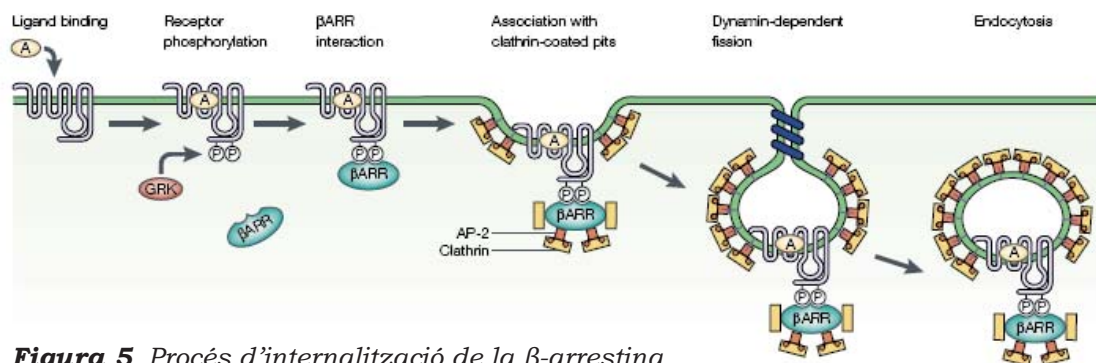


Figura 5. Procés d'internalització de la β -arrestina.
[Adaptat de l'article Pierce, K.L. et al., 2001]

La desensibilització pot ser heteròloga quan un lligant interfereix sobre l'activació de la cèl·lula diana per un altre lligant i homòloga, si afecta la resposta de si mateix. A més, el procés de desensibilització varia en funció del tipus cel·lular ja que expressen diferents cinases i fosforilen els receptors a diferents llocs i amb diferents cinètiques (Tobin et al., 2008).

1.3.2. Heterodimerització

Tradicionalment s'han estudiat els fenòmens de la neurotransmissió com una entitat individual formada pel receptor i el seu agonista. Al passar a estudiar què passa *in vivo*, però, s'ha demostrat que existeix una complexa xarxa on els receptors interaccionen físicament entre ells actuant com a unitats funcionals.

La interacció directa entre els receptors de membrana va ser proposada per Agnati i Fuxe, fa més de vint anys (Agnati & Fuxe, 1980). Ciruela i col. 1995, van demostrar per primera vegada que els receptors A_1 dimeritzen en extractes de cervell (A_1/A_1). A partir de l'any 2000, ha crescut enormement el nombre d'articles on descriuen que receptors d'adenosina poden formar

dímers, trímers, multímers, homòlegs o heteròlegs amb altres receptors acoblats a proteïna G. Gràcies a l'assaig de transferència d'energia per ressonància de bioluminiscència (BRET) i als experiments de co-immunoprecipitació s'han mostrat evidències de l'existència d'heterodímers entre els receptors A₁ i A_{2A} (Ciruela et al., 2006) i amb altres receptors com els de dopamina (Gines et al., 2000; Hillion et al., 2002; Canals et al., 2003), glutamat (Ciruela et al., 2001; Ferre et al., 2002) cannabinoids (Carriba et al., 2007) i receptors P2Y1 (Yoshioka et al., 2002).

El paper fisiològic de la formació d'heterodímers es posa de manifest per exemple en el cas dels heterodímers dels receptors d'A₁ i A_{2A} (Ciruela et al., 2006). Aquest receptors, acoblats a vies de senyalització de sentit oposat, permeten modular la resposta glutamatèrgica tan al nucli estriat (Ciruela et al., 2006) com a l'hipocamp. Els dos receptors d'adenosina tenen una afinitat diferent pel seu agonista endogen (**Taula 1**), que els permet un acurat control de la resposta. Com si es tractés d'un interruptor, a concentracions basals d'adenosina extracel·lular, el receptor A₁ s'acopla a la proteïna G_{i/o} disminuint l'alliberament de glutamat. Per altra banda, si augmenta la concentració d'adenosina, el receptor A₁ queda ràpidament saturat i s'activa el receptor A_{2A}. Aquest receptor es capaç d'inhibir el receptor A₁ i estimular l'alliberament de les vesícules de glutamat (Rebola et al., 2005).

1.4. El receptor A₁

1.4.1. Organització gènica

El receptor A₁ (326 aa) presenta un 90-95% d'homologia entre mamífers. El gen humà ADORA1, localitzat al cromosoma 1q32, codifica pel receptor d'adenosina A₁ (Townsend-Nicholson et al., 1995). Aquest gen està format per quatre exons: 1A, 1B, 2 i 3 i està sotmès al control de dos promotors independents: el promotor A, que produeix el *transcrit a* format pels exons 1A, 2 i 3; el promotor B, a uns 600 parells de bases i que genera el *transcrit β* format pels exons 1B, 2 i 3. El promotor A, és el responsable de l'expressió específica de teixit mentre que el promotor B intervé en l'expressió constitutiva (Ren & Stiles, 1995, 1998, 1999)(**Figura 6**).

III. Introducció

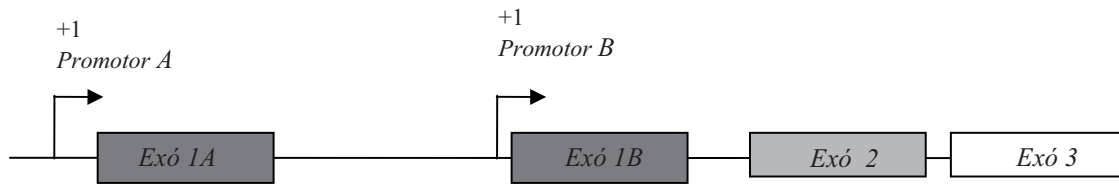


Figura 6. Estructura genòmica del gen humà ADORA1. [Adaptat de l'article Ren,H. 1995]

El receptor A_1 està distribuït per tot l'organisme però al cervell està fortament expressat a hipocamp, còrtex cerebral i cerebel. A més, l'expressen tots els tipus cel·lulars: les neurones, els astròcits, la microglia i els oligodendròcits (Fredholm et al., 2005).

1.4.2. Funcionalitat

El receptor A_1 juga un paper com a neuroprotector del SNC i està relacionat amb el control del son i la vigília, isquèmies, dolor, demència i l'ansietat. El receptor A_1 actua a través de dos mecanismes: la inhibició de l'alliberació de glutamat, a través de canals de Ca^{+2} (Cunha, 2001) i la inhibició de l'activitat neural, reduint la conductància del K^+ (Greene & Haas et al., 1991). El rol com a neuroprotector l'exerceix reduint l'exitotoxicitat del glutamat i per tant, reduint el dany en front d'una hipòxia o isquèmia. Durant l'envelliment s'han observat canvis en l'expressió del receptor A_1 tant en ratolins (Cunha, 2005) com en humans (Meyer et al., 2007). S'ha corroborat una disminució de l'expressió en hipocamp i còrtex de ratolins (Sperlagh et al., 1997; Cheng et al., 2000). La pèrdua del receptor en ratolins joves SAMP8 suggereix que pot tenir un paper en les malalties associades a l'envelliment com les malalties neurodegeneratives ja que es perd la capacitat neuroprotectora (Castillo et al., 2009). Aquests receptors s'han descrit alterats a l'alça en patologies com la malaltia d'Alzheimer, Creutzfeldt-jakob i a la malaltia de Pick (Angulo et al., 2003; Rodriguez et al., 2006; Albasanz et al., 2007).

1.5. El receptor A_{2A}

1.5.1. Organització gènica

Aquest receptor ha estat clonat en humà, rata, ratolí, gos i conill d'índies i la seva homologia entre espècies és d'un 90%. El gen ADORA2A codifica pel receptor A_{2A} i es troba localitzat en el cromosoma 22q11.2 (MacCollin et al., 1994). ADORA2A està format per tres exons: dos codificants (exó2 i exó3)

separats per un intró d'aproximadament unes 7 Kb i l'exó 1, no-codificant. L'exó 1 presenta sis isoformes específiques de teixit: h1A-h1F (Yu et al., 2004). L'exó humà 1E manté un 74% d'homologia amb l'exó m1C murí (**Figura 7**), fet que reforça el seu paper regulador de l'expressió del gen. El gen ADORA2A està regulat com a mínim per quatre promotors independents: P1A, P1B, P2 i P3 i tots els transcrits que s'han identificat contenen una seqüència comú en la regió 3'UTR i una regió 5'UTR canviant (Chu et al., 1996). S'ha descrit una expressió diferencial de les isoformes del receptor A_{2A} en els granulòcits de pacients amb sepsis, indicant un paper important de la regió 5'UTR en l'expressió d'aquest receptor (Kreth et al., 2008). Cal destacar que el receptor humà A_{2A} és polimòrfic i s'ha descrit una mutació silenciosa T1083C amb major freqüència en la població asiàtica (Soma et al., 1998).

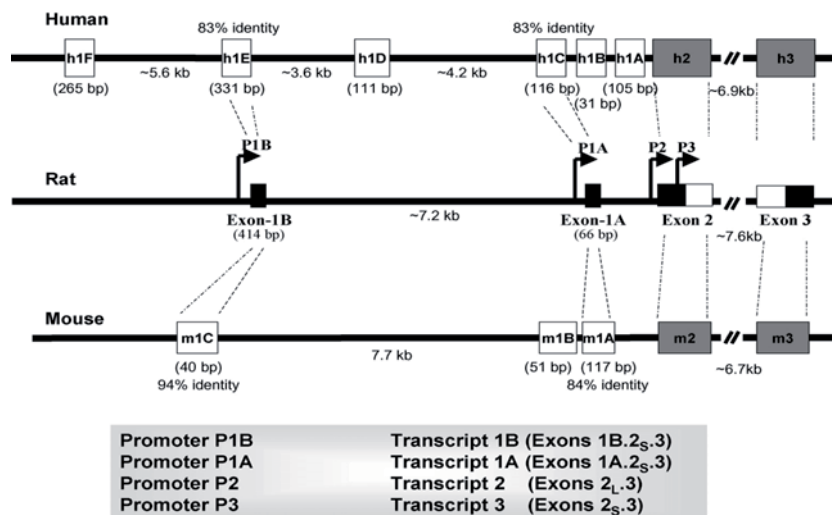


Figura 7. Esquema de l'estructura gènica del gen ADORA2A.
[Adaptat de Fredholm, B.B. 2007]

En el SNC, el receptor A_{2A} està abundantment expressat en les neurones gabaèrgiques de la via nigro-pallidal dels ganglis basals i en el bulb olfatori, tot i que es pot detectar per qPCR a tot el cervell. A més, s'expressa en astroglia, microglia i en els capil·lars sanguinis que atravesen el cervell (Fredholm et al., 2005).

1.5.2. Funcionalitat

Tot i tenir una localització majoritària als ganglis basals, els estudis amb preparacions de membranes han demostrat la presència dels receptors A_{2A} en altres estructures com el CF, tàlem i hipocamp (Wan et al., 1990). Sembla que pot tenir un paper diferent, tant per l'abundància com per la seva localització cel·lular, en el nucli estriat que a la resta del cervell (Cunha, 2005). En regions

III. Introducció

extraestriatals, el receptor A_{2A} regula l'alliberament de glutamat juntament amb el receptor A₁ però en sentit contrari, és a dir, té un paper facilitador. A més, regula l'alliberament de neurotransmissors com el GABA i la noradrenalina, que no estan controlats pel receptor A₁. De la regulació del receptor A_{2A} en parlem més endavant en l'apartat: **A_{2A} i ganglis basals**.

Durant l'envelliment el receptor A_{2A} augmenta la seva expressió (Rebola et al., 2003, 2005). S'ha observat que el receptor pot canviar el seu comportament a mesura que augmenta l'edat, per exemple s'ha descrit com el antagonistes del receptor A_{2A} disminueixen l'alliberament de glutamat en l'estriat de rates joves i l'augmenten en rates velles (Corsi et al., 2000). La desregulació de l'expressió del receptor està associada a patologies com l'epilèpsia, Parkinson, la isquèmia, el Huntington, l'esquizofrènia entre altres desordres psiquiàtrics (J. F. Chen et al., 1999; P. A. Jones et al., 1998; Popoli et al., 2002).

1.6. El receptors A_{2B} i A₃

A_{2B} (332 aa) va ser clonat a humà i ratolí amb un 45% d'homologia entre A_{2B}, A₁ i A_{2A}. El receptor A₃ (337 aa) va ser clonat en humà, rata, gos, conill i ovella i presenta un 72% i 85% d'identitat amb rata i ovella respectivament. A_{2B} té una baixa expressió a cervell i A₃ té nivells intermedis en algunes regions com el cerebel i hipocamp i, gairebé gens, a la resta del cervell.

2. LES MALALTIES NEURODEGENERATIVES

26.6 milions de persones en tot el món estan afectades per malalties neurodegeneratives i s'espera que al 2.050 la prevalència es quadruplicarà (Brookmeyer et al., 2007). Aquest, és un grup heterogeni de malalties on s'afecten àrees específiques del sistema nerviós, generant una progressiva pèrdua cognitiva i de moviment depenent del tipus específic de neurona que degeneri. Les més comuns són: malaltia d'alzheimer (AD), malaltia de parkinson (PD), l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) i la malaltia de Huntington (HD). El nombre de casos s'ha incrementat conjuntament amb l'esperança de vida i actualment s'han convertit en un problema tant de salut com econòmic en els països industrialitzats.

III. Introducció

L'etiologia d'aquestes malalties no es coneix tot i que es considera que l'acumulació de factors genètics, epigenètics i ambientals conjuntament amb esdeveniments estocàstics poden influir en el risc de patir la malaltia. Els factors genètics s'associen amb les formes familiars (5-10%), on mutacions específiques provoquen una aparició precoç de la malaltia. Els factors ambientals com són l'exposició a metalls i pesticides, el menjar, lesions cerebrals i infeccions han estat força estudiats, en molts casos, sense arribar a resultats concluent (Coppede et al., 2006).

Malgrat que presenten clíniques diferents les malalties neurodegeneratives conflueixen en unes mateixes vies moleculars basades en la interacció anormal entre proteïnes. Hi ha evidències d'acúmuls de proteïnes aberrants o mal plegades, formant protofibrilles i agregats insolubles en totes elles, tot i que la composició de l'agregat varia. També coincideixen en una desregulació del sistema ubiquitin-proteasoma, l'insult exitotòxic, l'activació de l'estrés cel·lular (oxidatiu, mitocondrial i de reticle endoplasmàtic), el dany mitocondrial, la pèrdua sinàptica i del transport axonal (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Les vies d'investigació per conèixer l'etiologia d'aquestes malalties han estat dos: l'estudi de les formes familiars i l'estudi bioquímic de les lesions neuropatològiques. La primera vegada que es va suggerir la relació directa entre les mutacions gèniques, els agregats proteics i les malalties neurodegeneratives va ser l'any 1991. Es va identificar un canvi en el codó 717 (d'isoleucina a valina) del gen de l'APP (proteïna precursora pèptid β amiloide) i per tant, un error en el seu processament, responsable d'un tipus d'Alzheimer familiar (ADf) (Yoshioka et al., 1991).

Les **formes familiars**, presenten mutacions específiques a través d'una herència autosòmica dominant. L'estudi d'aquestes mutacions ha permès postular teories al voltant de l'etiologia de cada patologia. Els fenotips d'aquestes formes familiars són molt semblants als de les esporàdiques amb la diferència de l'edat d'aparició. Les principals mutacions que es coneixen són: en ADf, mutacions en APP i la presenilina (PSEN1 i 2); en la demència frontotemporal amb parkinsonisme associada al cromosoma 17 (DFT-17), en el gen de la tau (MAPT) i en el gen de la progranulina. En la forma familiar de la malaltia de Parkinson (PDf) les principals mutacions són: al gen de la α -sinucleïna, a una cinasa rica en repeticions de leucina 2 (LRRK2), al gen de la parkina, a la PARK7 (DJ-1) i en el gen PINK1. De les formes de PDf es parlarà

III. Introducció

amb més profunditat en l'apartat dels **factors genètics de la malaltia de Parkinson** (Gosal et al., 2006).

Els **agregats proteics** permeten el diagnòstic definitiu de la patologia dels pacients a partir de l'estudi de la seva presència o absència i distribució en el cervell postmortem. Aquests agregats estan formats per proteïnes inicialment solubles que adopten una conformació de làmina β com estructura secundària, sovint ubiquitinitzada i típicament resistent a la degradació proteolítica (Lovestone & McLoughlin, 2002). Existeixen dos tipus de lesions: **dipòsits extracel·lulars**, les plaques senils (proteïna β -amiloïd) en AD i síndrome de Down (DS) i els dipòsits de les formes de la proteïna priònica (PrP^{sc}) en la malaltia de Creutzfeld-Jakob (CJD) i els **agregats intracel·lulars** que formen inclusions en els cossos cel·lulars, nuclis i els processos de les neurones o de cèl·lules glials. La composició bioquímica dels agregats és complexa (Armstrong et al., 2008).

Actualment les malalties neurodegeneratives es classifiquen clínicament en demències i desordres motors i, a nivell bioquímic, en funció de la proteïna majoritària que contenen en els agregats. La **Taula 2** és representativa de les principals malalties neurodegeneratives.

Taupaties	Alfa-Sinucleinopaties
<i>Malaltia d'Alzheimer</i> <i>Demència de grans argiròfils</i> <i>Malaltia de Pick</i> <i>Síndrome de Down</i> <i>Demència fronto-temporal associada al cromosoma 17</i> <i>Paràlisi supranuclear progressiva</i>	<i>Malaltia de Parkinson</i> <i>Demència amb Lewy bodies</i> <i>Atròfia multisistèmica</i>
	TDP-43 proteïnopaties
	<i>Degeneració frontotemporal lobar amb inclusions d'ubiquitina</i> <i>Esclerosi lateral amiotròfica</i>
Poliglutaminopaties	Prionopaties
<i>Malaltia de Huntington</i> <i>Atàxia espinocerevelar</i> <i>L'atròfia dentato-rubro-pàlido-Luysiana</i> <i>Malaltia de Kennedy</i>	<i>Malaltia de Creutzfeld-Jakob</i> <i>Insomni fatal</i> <i>Kuru</i> <i>Malaltia de Gerstmann-Straussler-Scheinker</i>

Taula 2. Classificació de les principals malalties neurodegeneratives en funció de la proteïna més abundant en els agregats. [Adaptat de l'article Woulfe et al., 2008]

Cal considerar que només en un petit nombre de pacients presenten mutacions en gens concrets. La gran majoria (aproximadament el 90%) de casos són esporàdics i no presenten cap evidència de mutacions en els gens de

les proteïnes agregades. Si la presència d'agregats intracel·lulars té una relació amb la etiologia de la malaltia o és un mecanisme de protecció de la cèl·lula ha estat un tema de discussió durant els últims anys. (**Figura 8**).

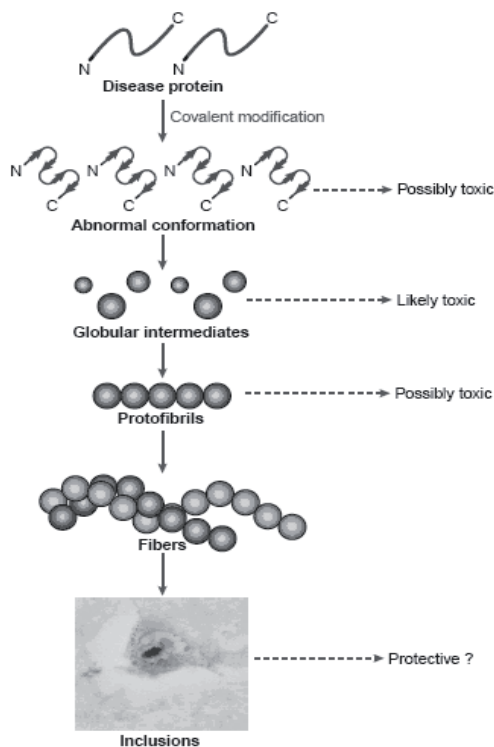


Figura 8. S'han proposat mecanismes responsables del plegament anòmal de les proteïnes: mutacions, modificacions postranscripcionals (fosforilació, oxidació, truncatge). El canvi conformacional és cap a estructures de tipus làmina β , que tendeixen a agregar formant intermediaris oligomèrics i formes protofibril·lars. El desequilibri entre la forma anòmala i la fisiològica, pot afectar a la homeòstasi cel·lular afectant al sistema del ubiquitin-proteasoma, transport axonal, la funció sinàptica... [Adaptat dels articles Dobson, C.M. 2004; Ross, C.A. 2004]

2.1. Taupaties

Les taupaties són el grup més comú de malalties neurodegeneratives. Al 1986, es va descriure la proteïna tau, com el component majoritari dels cabdells neurofibril·lars acumulats al citoplasma de les neurones degenerades en AD (Kosik et al., 1986). Tot i així, no es va demostrar que podia participar en l'etiologia de la malaltia, fins que es va identificar com una mutació del gen de la tau, produïa la demència frontotemporal amb parkinsonisme associada al cromosoma 17 (DFTP-17) (Spillantini et al., 2000). En els últims anys s'han identificat 34 mutacions patogèniques del gen MAPT patològiques en 101 famílies en tot el món.

Els cabdells neurofibril·lars contenen la tau hiperfosforilada formant parells helicoidals de filaments (en l'anglès PHF) que van substituint progressivament el citoesquelet de la neurona i quedant acumulada en agregats intracel·lulars (Grundke-Iqbal et al., 1986).

III. Introducció

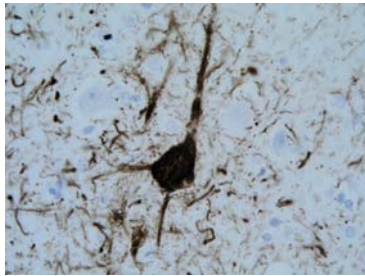


Figura 9. Neurona amb degeneració neurofibril·lar. Immunohistoquímica contra AT-8. La composició dels cabdells neurofibril·lars és: ApoE, HSPG, ubiquitina, proteïna NF, sinaptofisina, MAC, bFGF, pèptid β -amiloid i 3R/4R Tau. [HSPG, proteoglicans del tipus heparan sulfat]

2.1.1. La proteïna tau

La tau és una proteïna associada a microtúbuls que forma part del citoesquelet de les neurones i és important en la neurogènesi. La seva funció és essencial en el transport axonal i està regulada tant a nivell genètic com a nivell funcional. El control genètic, és a través de l'existència de 6 isoformes expressades en el sistema nerviós adult, totes derivades d'un únic gen. El gen que codifica per la proteïna tau s'anomena MAPT (110 Kb) està localitzat al cromosoma 17 en la posició q21 (Neve et al. 1986). Aquest gen consta de 16 exons que generen 6 isoformes via splicing alternatiu a cervell (Andreadis et al., 1995). Es poden classificar en funció de l'absència o presència dels exons 2, 3 i 10 (Sergeant et al., 2005).

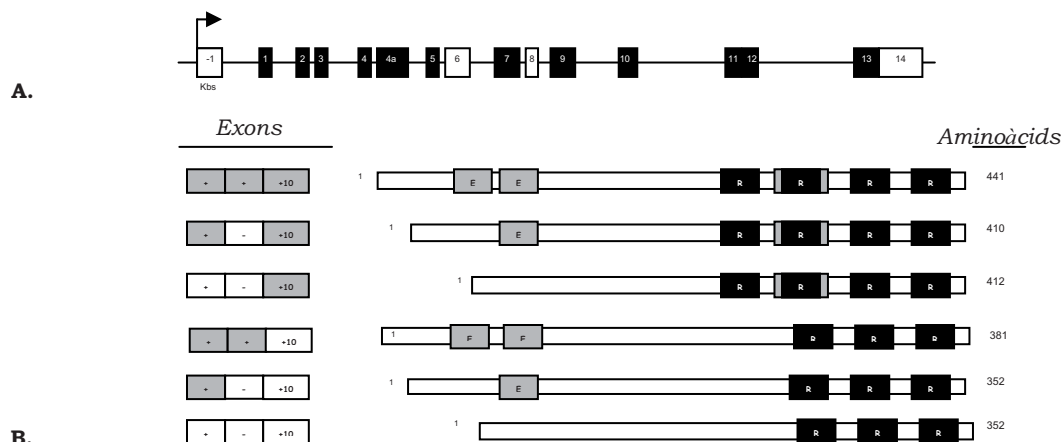


Figura 10. A. Estructura del gen humà MAPT. Les caixes negres indiquen els exons codificants i les caixes blanques els no codificants. **B.** Les 6 isoformes de la proteïna tau humana presents en el sistema nerviós d'un adult es diferencien per la presència o absència dels exons 2, 3 i 10. [Adaptat de l'article Sergeant et al., 2005].

La regulació a nivell de proteïna té lloc per fosforilació. En condicions fisiològiques, tau es troba sota un equilibri constant que li permet unir-se i desunir-se als microtúbuls cíclicament, controlat per fosforilació. Es coneixen diferents cinases: la cinasa de la glicogen sintasa 3, de l'anglès GSK3; la cinasa dependent de ciclina 5, de l'anglès CDK5; les cinases regulada per senyals extracel·lulars, de l'anglès ERK 1 i 2; la cinasa reguladora de l'afinitat pels microtúbuls, de l'anglès MARK. Per altra banda, hi ha diferents fosfatases com PP1, PP2A, PP2B i PP2C que *in vitro* tenen la tau com a substrat. S'han descrit alteracions d'expressió i localització en les taupaties (Ferrer et al., 2001.a; Ferrer et al., 2001.b).

2.1.2. El paper funcional de la tau

En el cervell humà la proteïna tau forma una família de sis isoformes d'entre 352 i 441 aa (**Figura 10**) i el seu pes molecular és al voltant de 45 i 65kDa. Aquestes isoformes es diferencien en l'extrem N-terminal i per tenir 3 o 4 regions repetitives en l'extrem C-terminal per on s'uneixen a la tubulina dels microtúbuls. En condicions fisiològiques, la tau manté un estret equilibri entre el seu estat fosforilat i no unit als microtúbuls, i el no fosforilat i unit. En condicions patològiques, la fosforilació anormal de tau trenca aquest l'equilibri dinàmic, augmentant els nivells de tau a la fracció citosòlica (Ballatore et al., 2007). En aquestes condicions, la tau no pot realitzar la seva funció i es desestructura el tràfic vesicular axonal. Un model del paper de la tau en la neurodegeneració ha estat proposat per Dixit et al., 2008. (**Figura 11**).

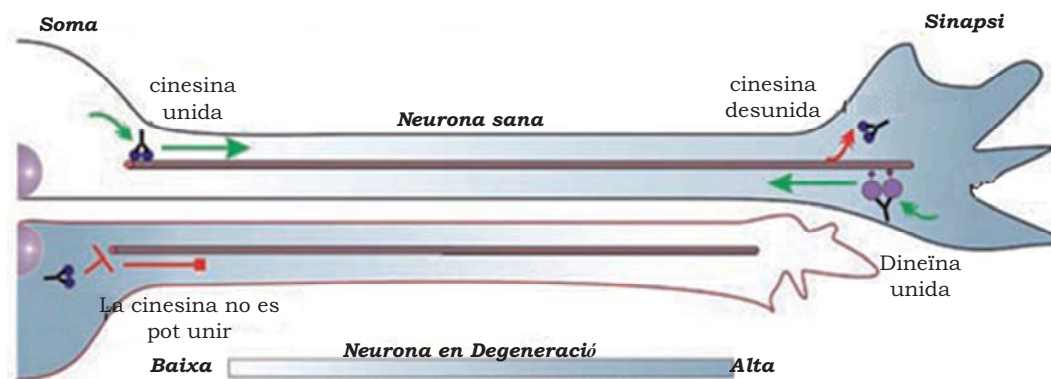


Figura 11. Model del paper de Tau en la regulació del transport axonal. En una neurona sana, la proteïna tau està distribuïda en gradient desde l'extrem proximal al distal. Aquest fet permet el transport autoretrògrad de la cinesina des de el cos cel·lular a la sinàpsi. A l'extrem sinàptic, amb una major concentració de tau, permet la dissociació de la cinesina i la unió de la dineïna que permet el transport anterògrad. [Adaptat de l'article Dixit et al., 2008]

III. Introducció

El motiu pel qual la proteïna tau comença a tenir un comportament tòxic no es coneix. Mutacions en el gen de la tau, alteracions de l'equilibri entre cinases i fosfatases (augment de les cinases dependents d'estrès oxidatiu) o modificacions covalents que promoguin el canvi conformacional són possibles causes que poden provocar l'augment de la tau citosòlica. El canvi conformacional de la tau augmenta la concentració de la forma no unida dipositant-se en la neurona en forma de pre-cabdells (en anglès pretangle). En un nivell d'agregació major és quan s'observa l'estructura en làmina β dels filaments hiperfosforilats de tau i la formació dels cabdells neurofibril·lars que degeneren la neurona o NFT en anglès (Ballatore et al., 2007). Constantment apareixen noves hipòtesis per tal d'explicar el guany de funció tòxica de la tau. En aquest sentit recentment s'ha proposat la possibilitat de que algunes formes de ADf pugin ser transmissibles (Clavaguera et al., 2009).

2.1.3. La malaltia de grans argiròfils (AGD)

La malaltia de grans argiròfils (AGD) és una taupatia esporàdica d'aparició tardana. La principal marca histopatològica que presenta són uns agregats de la proteïna tau hiperfosforilada anomenats grans argiròfils (GAs) en el còrtex entorrinal, hipocamp, amígdala i a la regió veïna del còrtex temporal (Braak & Braak, 1987; Togo et al., 2002).

Desde que Braak i Braak, al 1987, van descriure per primera vegada la AGD, ha estat en continua revisió per tal de considerar-la una entitat independent o una lesió associada a altres malalties neurodegeneratives. Els principals motius de controvèrsia són: que els GAs acostumen a estar associats a altres taupaties com AD, PiD, PSP, CBS, CJD i α -sinucleopaties com PD i DLB i que un 30% no presenten dèficit cognitiu (Grinberg et al., 2009).

L'incidència és d'entre un 4 i 5% de la població general observant un increment associat a l'envelliment. Sovint no és fàcil definir una simptomatologia clarament associada a la AGD tot i que sembla, que els canvis d'humor i els desequilibris emocionals i de personalitat, juntament amb esporàdiques pèrdues de memòria són coincidents en la majoria dels pacients (Ikeda et al., 2000).

2.1.3.1. Característiques neuropatològiques

La AGD deu el seu nom a la presència de grans argiròfils tot i que presenta altres alteracions. S'han descrit agregats de tau hiperfosforilat en neurones (en forma de pre-cabdells neurofibril·lars i grans argiròfils), astròcits positius per tau i cossos d'inclusió en oligodendròcits. També s'ha descrit la presència de neurones balonades que contenen acúmuls de $\alpha\beta$ -cristalina, encara que es consideren lesions inespecífiques (Fujino et al., 2004, Ferrer et al., 2008).



Els *grans argiròfils* deuen el seu nom a la potent coloració que presenten amb la tinció de iodur de plata de Gallyas. Aquests són petits (entre 4-8 *micres*) i localitzats a les dendrites i als arbres dendrítics.

Figura 12. Grans argiròfils

La composició bioquímica dels grans argiròfils i de les neurones en cabdells neurofibril·lars és molt semblant. Amdos casos presenten la tau hiperfosforilada i poliubiquitinada co-localitzant amb p62/sequestrosoma, amb una tau de menor pes molecular (o tau truncada), ubiquitina, una ubiquitina mutada (UBB⁺¹) i recentment s'ha descrit la localització anòmala de TDP-43 (Ferrer et al., 2008; Fujishiro et al., 2009).

L'origen d'aquests agregats prové, possiblement, de les neurones de projecció amb cabdells neurofibril·lars del còrtex entorrinal, la regió CA1 hipocampal, gir dentat i còrtex temporal entre altres. S'han proposat dues classificacions basades en la distribució dels grans argiròfils que estableixen entre tres i quatre estadiatges (Ferrer et al., 2008; Saito et al., 2004).

III. Introducció

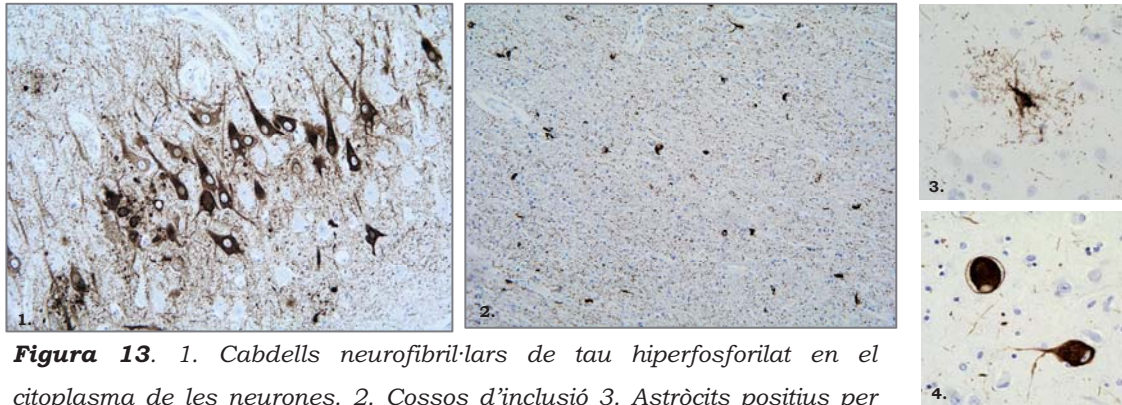


Figura 13. 1. Cabdells neurofibril·lars de tau hiperfosforilat en el citoplasma de les neurones. 2. Cossos d'inclusió 3. Astròcits positius per tau 4. Neurones balonades.

Les neurones amb cabdells neurofibril·lars, no es diferencien de les que es troben en AD i presenten una distribució paral·lela als grans argiròfils.

2.1.3.2. Etiologia

Tot i estar molt lluny de conèixer l'etiologia de la malaltia sembla que l'edat i l'estrès oxidatiu propi de l'envelliment tenen un paper capdal en la AGD. Convergeixen cinc factors que poden tenir diferent grau d'importància en el desenvolupament de la patologia tot i que, ara per ara, no es coneix:

- L'**estrès oxidatiu** indueix a les cinases d'estrès que provoquen l'increment de la fosforilació de tau (Ferrer et al., 2002, 2003).
- La presència d'**ubiquitina mutada** (UBB⁺¹) en els agregats suggereix un mal funcionament del sistema del proteasoma (Fischer et al., 2003).
- La proteïna **p62** s'agrega en els cabdells ja que té una gran afinitat amb les cadenes d'ubiquitina. S'ha proposat que té un paper promovent l'agregació i traslladant les proteïnes poliubiquitinades cap al proteasoma per la seva degradació (Kuusisto et al., 2002; Ferrer et al., 2008).
- La presència de **tau truncada** en els agregats. Curiosament, la sobreexpressió d'aquesta tau en rates produeix degeneració neurofibril·lar, suggerint un paper en la etiologia de la malaltia (Zilka et al., 2006).

- Els acúmuls del factor de transcripció **TDP-43**, tot i que encara no s'en coneix el seu rol (Fujishiro et al., 2009).

2.1.3.3. Factors genètics

Els factors genètics sembla que no són gaire rellevants ja que només s'ha trobat una forma familiar de la malaltia. Es tracta d'un cas amb un fenotip semblant a la AGD associat a una mutació nova S305I MAPT (Kovacs et al., 2008). El principal factor de risc de AD, l'al·lel ApoE ϵ 4, no sembla tenir relació tot i que l'al·lel ApoE ϵ 2 sembla més freqüent que en casos AD (Ghebremedhin et al., 1998).

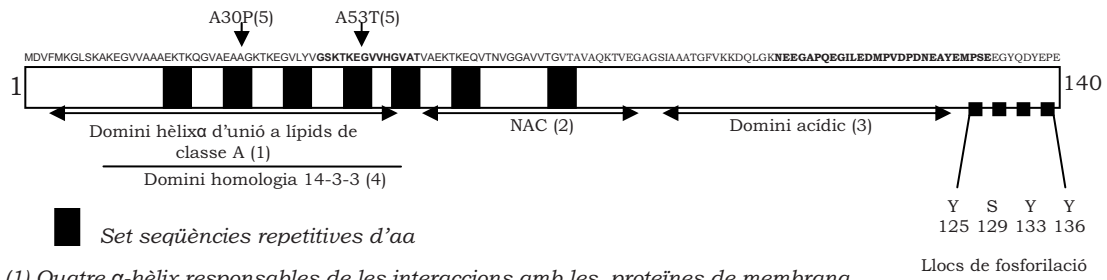
2.2. α -sinucleïnopaties

Les **α -sinucleïnopaties** són un conjunt de malalties que es caracteritzen per la presència de dipòsits anormals de proteïnes, anomenats cossos de Lewy (**Taula 3**). Al 1993, la α -sinucleïna va ser aïllada com el component no amiloideu (NAC) de les plaques senils de pacients amb la AD (Ueda et al., 1993). Al 1997, van apareixer dos articles on identificaven aquesta proteïna com la responsable d'una PDF i com el component majoritari dels cossos de Lewy (Polymeropoulos et al., 1997; Spillantini et al., 1997). A partir d'aquests fets, la sinucleïna va passar a ser la diana principal en l'estudi de l'etiologia d'aquestes malalties.

2.2.1. La proteïna α -sinucleïna

L' **α -sinucleïna** pertany a una família multigènica altament conservada. Està codificada en el gen SNCA o PARK1 localitzat en la regió q21.3-q22 del cromosoma 4. Aquesta família la conformen dos proteïnes més: β - (5q35) i γ -sinucleïna (10q23), les quals han estat descrites només en vertebrats (Spillantini et al., 1995).

III. Introducció



(1) Quatre α -hèlix responsables de les interaccions amb les proteïnes de membrana

(2) NAC, fragment que es troba a les plaques senils

(3) Domini acidí, un C-terminal sense estructura secundària

(4) Cinc α -hèlix responsables de les interaccions proteïna-proteïna

(5) Mutacions sense sentit als residus 30 (A30P) i 53 (A53T)

Figura 14. Estructura de la seqüència d'aminoàcids i possibles estructures secundàries de la α -sinucleïna [Adaptat de l'article Beyer, 2006]

L' α -sinucleïna és una proteïna soluble, àcida i altament conservada de 140aa i 19Kda, sense una estructura secundària típica, localitzada majoritàriament als terminal presinàptics. La seva seqüència d'aminoàcids conté set regions repetides dels aminoàcids KTKEGV imperfectes, que conformen les cinc hèlix anifàtiques de l'extrem N-terminal (**Figura 14**). S'ha especulat que pot estar associada a vesícules lipídiques (**Figura 15**). L'extrem C-terminal roman sense estructura secundària i és una regió àcida amb alt contingut de glutamat.

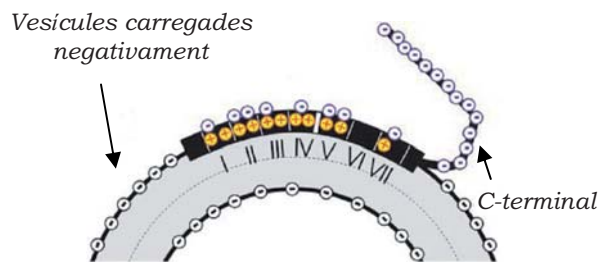


Figura 15. La seqüència N-terminal amb l'estructura α -hèlix i carregada positivament, pot interaccionar amb la vesícula. L'extrem C-terminal no té estructura secundària i no interacciona amb els lípids. [Adaptat del'article Jao, C.C. 2004]

2.2.2. El paper funcional de l' α -sinucleïna

Malgrat la possibilitat d'interaccionar amb les vesícules carregades negativament, per ara, es considera una proteïna sense una funció definida. L'estructura bioquímica de la sinucleïna suggereix una forta capacitat

d'interaccionar amb altres proteïnes tant perquè té dominis homòlegs a la xaperona 14-3-3 com perquè interacciona amb nombroses proteïnes relacionades amb la homeòstasi de la dopamina als terminals axònics. Una d'aquestes és la *fosfolipasa D2* que podria regular el contingut de la vesícula i del magatzem de dopamina (Ueda et al., 1993; Ostrerova et al., 1999). En ratolins amb la mutació A30P (**Figura 14**) i en pacients amb LBD s'ha descrit que la sinucleïna i Rab3a perden la seva interacció. Les proteïnes Rab són GTPases associades al transport de membrana, al tràfic vesicular i la exocitòsi durant la sinàpsi. Així, la pèrdua d'interacció amb Rab3A suggereix un mal funcionament de la neurotransmissió (Dalfo et al., 2004; Dalfo & Ferrer, 2005).

El desencadenant del guany de funció tòxica de l' α -sinucleïna no es coneix. Per alguna raó, es trenca l'equilibri entre la forma anòmala i la normal, ja sigui per una mutació en el gen SNCA, per una modificació postranscripcional o per altres motius. En aquest punt, la forma monomèrica insoluble comença a agregar i s'estabilitza a través de la conformació de làmina β , formant fibril·les d'alt pes molecular. Paral·lelament, el canvi de l'activitat elèctrica de les neurones altera la unió de la sinucleïna a les vesícules. El truncatge, la fosforilació de Ser129 i la nitració a través de espècies reactives de nitrògen augmenten la possibilitat de l'agregació. Aquest procés neurotòxic pot alterar: el transport ER-golgi, les vesícules sinàptiques, mitocondris i lisosomes tant perquè la sinucleïna deixa de fer la seva funció com per l'aparició de l'agregat intracel·lular.

2.2.3. Classificació de les sinucleïnopaties

La malaltia de Parkinson (PD), la demència de cossos de Lewy (LBD) i l'atròfia multisistèmica (MSA) són les patologies de major incidència en aquesta família (**Taula 2**). La PD i LBD presenten cossos de Lewy en el citoplasma neuronal i les neurites de Lewy. La seva distribució és específica ja que, en la PD es localitzen en el tronc encefàlic, mentre a la LBD estan repartits per totes les regions cerebrals. Clínicament, la PD produeix alteracions del moviment i la LBD, demència. En canvi, en la MSA els agregats d' α -sinucleïna es troben en inclusions glials citoplasmàtiques (GCI).

III. Introducció

2.2.4. La malaltia de parkinson

El parkinsonisme és una alteració motora que produeix bradicinèsia, hipocinèsia, rigidesa i tremolor descrita per James Parkinson al 1817 com a principal característica de la *paralisi agitans* (Parkinson, 2002). El parkinsonisme apareix com a símptoma de diverses malalties neurodegeneratives com per exemple: PD, PSP, MSA, LBD, AD avançada. També apareix en altres condicions: infeccions, intoxicacions i fenòmens postraumàtics.

2.2.4.1. Característiques neuropatològiques

La PD es caracteritza per la degeneració del sistema nigro-estriatal juntament amb neurones del *locus coeruleus*, nucli dorsal del vagus, nucli del rafe i Meynert. A més dels símptomes motors descrits, presenta símptomes no motors com són: dèficit olfatori, desordres del son, depressió, ansietat, alteració intestinal i disfunció erèctil. Aquests símptomes són prematurs i estan associats a canvis patològics dels nuclis dorsals glossofaríngeis, nervis vagals i anterior, nucli olfatori i eventualment acompanyat per canvis al neocòrtex (Grinberg et al., 2009).

La degeneració específica d'aquesta via posa de manifest la vulnerabilitat de les neurones de la via nigro-estriatal respecte a qualsevol altre. Aquestes neurones són de projecció, poc o gens mielinitzats (Hawkes et al., 2009; Braak et al., 2004). La pèrdua neuronal va acompanyada de tres tipus d'inclusions: els cossos de Lewy, els cossos pàlids i les neurites de Lewy.

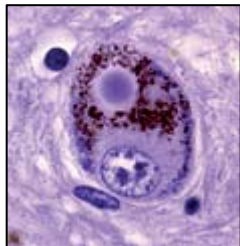


Figura 16. La composició dels cossos de Lewy no es coneix completament, però se sap que estan formats per: α -sinucleïna, tau, ubiquitina, tubulina, MAP5, cdk5, proteïnes IF, $\alpha\beta$ -cristalina, proteïna NF, UCHL-1, A β , APP, Gelsolin, Rab3a, sinfilina i Cu/Zn SOD

Tanmateix, un 10% de persones majors de 60 anys presenten cossos de Lewy sense simptomatologia. Aquesta afectació s'ha considerat per Braak i col·laboradors, com un estadiatge preclínic de la PD i s'han classificat segons les àrees d'afectació dels cossos de Lewy en sis estadiatges diferents. Clínicament es considera PD els estadiatges 3 i 4 (Braak, H. 2004).

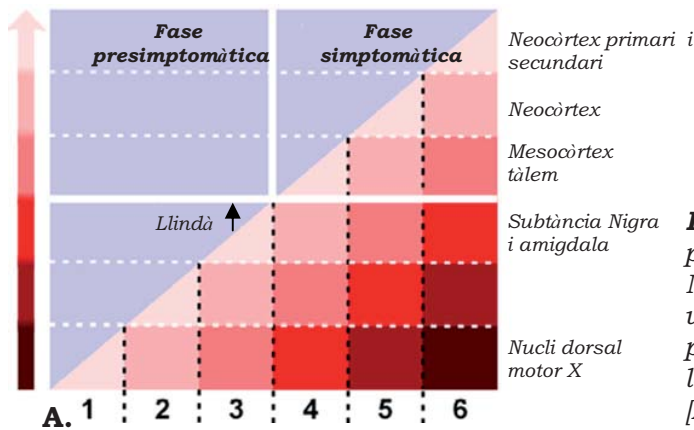


Figura 17. A. Estadiatge presimptomàtic i simptomàtic de la MP. La intensitat del color indica un increment en la severitat de la patologia. B. El diagrama mostra la progressió de la patologia. [Adaptat de Braak, H. 2004]

Aquest diagrama (**Figura 17.B**) suggereix que la patologia comença al plexe gàstric autònom de Meynert i al final del nervi olfactori seguint les vies nervioses des de la regió inferior del tronc encefàlic fins la part més rostral afectant a als ganglis basals, en concret a la *substància nigra pars compacta* (SNPc). Recentment Braak H i els seus col·laboradors han proposat una hipòtesi sobre la etiologia de la PD. Aquesta teoria anomenada teoria dual o “dual hit” es basa en que un patògen desconegut podria utilitzar tan el nas com els intestins com a porta d’entrada al sistema nerviós (Hawkes et al., 2009).

2.2.4.2. Factor genètics

En els últims anys s’han descrit gens responsables de formes familiars de la MP. El primer gen identificat va ser el **SNCA o PARK1** (4q21-22) que codifica per la α -sinucleïna i on s’ha identificat tres mutacions patogèniques (A30P, E476K i A53T) a més de duplicacions i triplicacions (**Figura 14**). Juntament amb el SNCA dos gens més estàn relacionats amb mutacions autosòmiques dominants amb presència de cossos de Lewy: el gen dardarina o **LRRK 2** (cinasa rica en leucina 2) (**PARK 8**) (Hernandez et al., 2005) i una glucocerebrosidasa o **GBA** (1q21)(Goker-Alpan et al., 2008). Alguns pacients que presenten mutacions en l’ α -sinucleïna, LRRK-2 o GBA, són indistingibles dels malalts de parkinson ideopàtic en el diagnòstic histopatològic postmortem. Per altra banda, hi ha mutacions de pèrdua de funció associades amb el parkinsonisme sense presència de cossos de Lewy: en el gen **DJ-1 (PARK7)** (Kitada et al., 1998), en la quinasa mitocondrial induïda per PTEN (**PINK1**) (Gosal et al., 2006), en la ubiquitina lligasa o parkina (**PRKN o PARK2**), i en

III. Introducció

l'ATP13A2. Aquestes mutacions són responsables d'una forma autosòmica recessiva de parkinsonisme precoç (Lees et al., 2009)(**Taula 3**).

	Histopatologia	Tipus de mutació
Parkina	Degeneració de la Substància Nigra però sense presència de cossos de Lewy	Mutació recessiva
PINK	sense cossos de Lewy	Mutació recessiva
DJ-1	sense cossos de Lewy	Mutació recessiva
ATP132A2	sense cossos de Lewy	Mutació recessiva
sinucleïna	Cossos de Lewy	Mutacions Dominants i Duplicacions
LRRK2	Cossos de Lewy	Mutacions Dominants

Taula 3. Gens associats al Parkinsonisme. [Adaptat de l'article Lees,A.J. 2009]

2.2.4.3. Etiologia

Encara que el PD es considera un desordre esporàdic s'han descrit algunes causes mediambientals com per exemple, la neurotoxina MPTP (*1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina*) i els pesticides com la rotenona, que entre altres, poden causar una clínica similar (Langston et al.,1983). Ambdós compostos alteren la cadena respiratòria mitocondrial i produeixen la mort de les neurones de la substància nigra. El factor de risc principal per al parkinson idiopàtic continua sent l'envelliment i la major conseqüència clínica la bradicinèsia.

2.2.4.4. Els ganglis basals i el moviment

Els ganglis basals són un conjunt de nuclis altament interconnectats que s'associen amb el control dels moviments involuntaris que han estat prèviament apresos. Els ganglis els conformen: el nucli estriat (caudat i putamen), la substància nigra (pars reticulata, SNPr i pars compacta, SNPc), el globus pàl·lid (intern, Gpi i extern, Gpe) i el nucli subtalàmic (NST). El nucli estriat és la principal porta d'entrada del circuit dels ganglis basals.

En el nucli estriat, hi ha dos poblacions de neurones gabaèrgiques d'acord amb el patró d'expressió peptídica: neurones que expressen encefalina i neurones que expressen dineïna. Aquestes dos poblacions neuronals

delimiten la connexió cortical amb els ganglis a través de dos vies: la via directa, que indueix moviment i la indirecta, que l'inhibeix. El circuit controla el moviment a través de dos vies: la via indirecta (estriat, GPe, NST i GPi) i la via directa (estriat, SNpc i Gpi). És l'equilibri entre aquestes vies el responsable dels desordres motors. Com s'observa en la **Figura 18**, la desaparició d'aproximadament un 60% de les neurones de la SNpc produeix hiperactivitat del Gpi i el NST augmentant la senyal gabaèrgica cap a les zones talàmiques i en conseqüència corticals, produint hipocinèsia (**Figura 18**) (Schwarzschild et al., 2006).

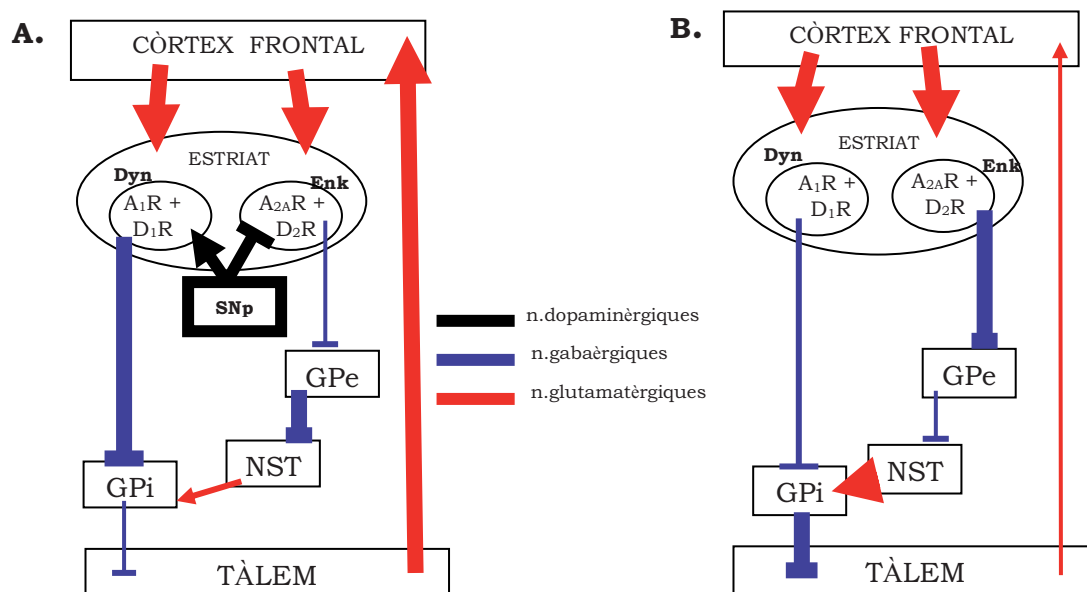


Figura 18. Diagrama anatòmic on es relacionen els nuclis dels ganglis basals responsables del control motor. El circuit controla el moviment a través de dos vies: la via indirecta (estriat, GPe, NST i GPi) i la via directa (estriat, SNpc i Gpi). **A.** En condicions normals, les vies dopaminèrgiques tenen un efecte inhibitori de la via indirecta cosa que permet el moviment **B.** La disminució de dopamina, disminueix la via directa i augmenta la via indirecta. Aquest desequilibri, produeix una inhibició de les vies talàmiques i en conseqüència, de les corticals que provoquen una reducció del moviment. [Adaptació de l'article Schwarzschild, M.A. 2006]

2.2.4.5. Ganglis basals i el receptor d'adenosina A_{2A} (A_{2A}R)

El nucli estriat dels ganglis basals el conformen en un 90%, neurones de projecció gabaèrgiques amb alta densitat d'espines dendrítiques. Aquestes neurones reben informació per dos vies aferents principals: les neurones

III. Introducció

glutamatèrgiques, que provenen del còrtex frontal, nucli talàmic i sistema límbic i les *neurones dopaminèrgiques*, que provenen de la SNPc a la PD i àrea tegmental ventral (ATV)(**Figura 19.A**). Ambós vies convergeixen, juntament amb els terminals colinèrgics i les interneurons gabaèrgiques en les espines dendrítiques. Els botons glutamatèrgics interaccionen per la part apical de l'espina i les vies dopaminèrgiques i colinèrgiques ho fan al coll on la seva funció és modular la senyal glutamatèrgica (**Figura 19.A**).

L'adenosina és un altre neuromodulador important de les sinàpsis glutamatèrgiques de l'estriat a través els seus receptors distribuïts tant en les neurones presinàptiques com postsinàptiques. El mecanisme de modulació adenosinèrgica és diferent a la modulació dopaminèrgica. Mentre la dopamina és un neurotransmissor que depèn de l'impuls sinàptic, l'adenosina és un neuromodulador local producte de la pròpia funció estriatal. El receptor $A_{2A}R$, està específicament localitzat en les neurones encefalinèrgiques estriatals, responsables de la via indirecta. Aquest receptor exerceix una funció antagonista sobre el receptor de dopamina 2 (D_2R) i el receptor A_1R i sinèrgica sobre el receptor metabotròpic de glutamat 5 (mGlu5R) (Ferre et al., 2002 , 2005). En les neurones presinàptiques es formen els heteròmers A_1R , $A_{2A}R$, i mGlu5R per tal de controlar l'impuls glutamatèrgic i, a les neurones postsinàptiques trobem els heteròmers D_2R , $A_{2A}R$, i mGlu5R, per tal de modular l'activació gabaèrgica (**Figura 19.B**).

Des de un punt de vista funcional, entendre el paper del $A_{2A}R$ en els heterodímers postsinàptics i presinàptics de la neurotransmissió glutamatèrgica, permet conèixer quin paper juga el receptor en les patologies associades als ganglis basals. En condicions fisiològiques, la concentració d'adenosina extracel·lular és baixa, probablement a causa d'una baixa estimulació cortical. En aquestes condicions, s'activa el receptor A_1R de la neurona presinàptica reduint l'exocitosi del glutamat i en la postsinàptica, el receptor D_2R es manté actiu. En canvi, davant d'un fort estímul excitatori, presinàpticament, el receptor $A_{2A}R$ s'activa facilitant l'alliberament glutamatèrgic i postsinàpticament produeix una forta inhibició del receptor D_2R . El $A_{2A}R$ té un paper en el control de les sinapsis glutamatèrgiques durant períodes de forta excitació activant mecanismes que intervenen en excitabilitat neuronal i la plasticitat sinàptica a través dels canvis de l'expressió gènica (**Figura 19. C i D**).

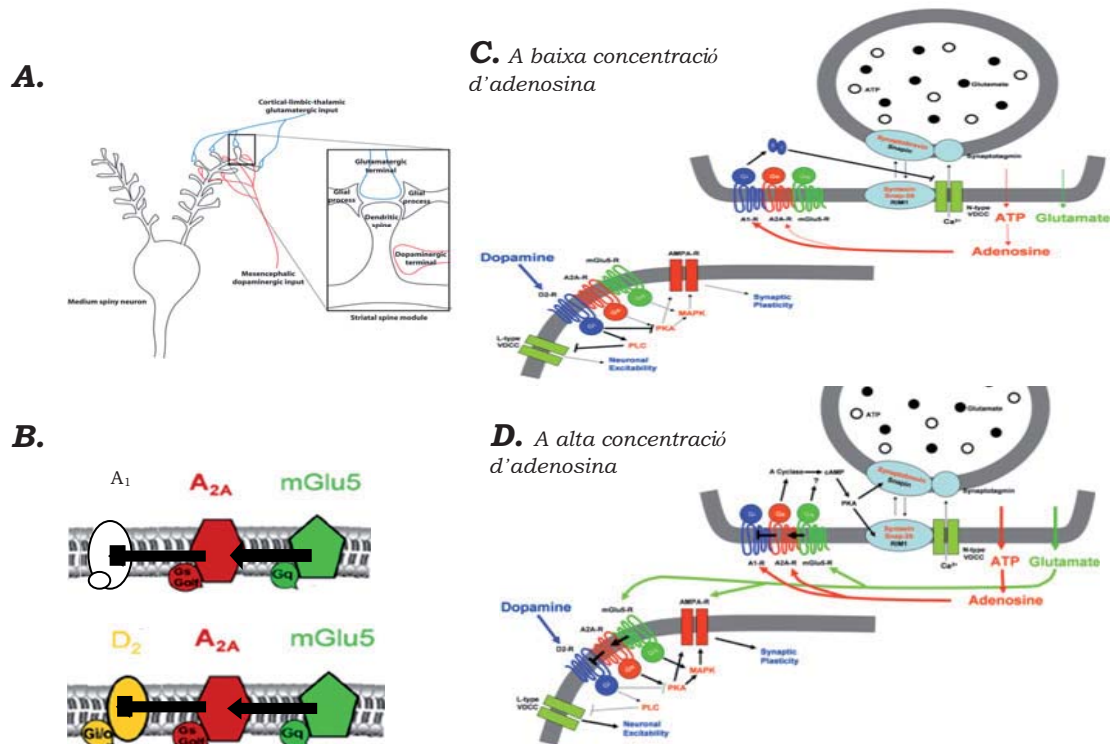


Figura 19. **A.** Esquema de les aferències de les espines dendrítiques de les neurones gabaèrgiques **B.** Heterodímers de A_{2A}R en la sinàpsis estriatal. L'activació d'A_{2A}R inhibeix D₂R i A₁R **C.** A baixes concentracions d'adenosina, A₁R actua predominantment evitant l'entrada de Ca²⁺ i l'alliberament de la vesícula sinàptica. **D.** En canvi, si la concentració d'adenosina al medi augmenta, a nivell presinàptic s'insensibilitza el A₁R i s'activa el receptor A_{2A}R, que permet l'entrada de Ca²⁺ i l'alliberament de la vesícula. L'augment de glutamat en el terminal induïx a nivell postsinàptic una activació del receptor A_{2A}R, el qual inhibeix la senyal dopaminèrgica [Adaptat de l'article Schiffmann, S.N. 2007]

2.2.4.6. Teràpia

La teràpia de reemplaçament de dopamina pel seu precursor, la L-Dopa, és la més efectiva pels primers símptomes motors de la PD. Malgrat això, a partir dels dos anys de tractament, els pacients poden desenvolupar discinèsies i fluctuacions motores en resposta a la dosi de L-Dopa (Obeso et al., 2000). La raó per qual apareixen aquests efectes secundaris no es coneix. S'ha suggerit que la pèrdua de terminals, les fluctuacions de levodopa en el plasma i l'estimulació pulsàtil, induïxen canvis d'expressió gènica a nivell postsinàptic. Aquests canvis, resulten en una alteració de les vies de comunicació neuronal produint discinèsies (Olanow & Obeso, 2000). A més, s'ha descrit un augment de l'expressió del A_{2A}R en pacients de PD que presenten discinèsia com conseqüència del tractament amb L-Dopa. Aquest

III. Introducció

increment d'expressió es tradueix amb una major inhibició del receptor D₂R (Calon et al., 2004; Varani et al., 2009).

Per tal d'evitar els efectes secundaris d'aquest tractament, s'han desenvolupat teràpies no-dopaminèrgiques alternatives. En aquesta direcció, estudis preclínics recents, utilitzant antagonistes selectius dels A_{2A}R permeten una millora del tremor, redueixen el progrés de la neurodegeneració i la desensibilització derivada del tractament amb L-Dopa (Chase et al., 2003; Bara-Jimenez et al., 2003; Pinna et al., 2007; Lewitt et al., 2008; Simola et al., 2008). Els antagonistes de l' A_{2A}R han demostrat efectes tant en el tractament combinat com per sí sols (Aoyama et al., 2000).

3. LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL

3.1. L'organització de la cromatina

Els eucariotes superiors organitzen la informació genètica en 23 parells de cromosomes que contenen aproximadament 25.000 gens. La molècula d'ADN té aproximadament dos metres i es troba compactada unes 10.000 vegades dins del nucli cel·lular. Aquest ADN està protegit per una coberta proteica formada per histones que, a més, li permeten empaquetar-se formant la cromatina. La unitat funcional de la cromatina s'anomena: nucleosoma (Kornberg et al., 1974). Cada nucleosoma està format per un octàmer d'histones (amb dos unitats de cada histona H2A, H2B, H3 i H4) al voltant de les quals es disposen 147 parells de bases d'ADN que donen 1,67 voltes superhelicoidals levògires. La suma de l'octàmer d'histones i l'ADN conformen la partícula *core* del nucleosoma (**Figura 23**) (Luger et al., 1997; J. O. Thomas & Kornberg, 1975; Richmond & Davey, 2003). El nucleosoma completa un fragment d'ADN de longitud variable d'entre 10 i 90 parells de bases d'ADN que connecta cada partícula de *core* amb les demés. La consecució dels nucleosomes dona lloc a una fibra polinucleosomal d'uns 10nm de diàmetre. Aquesta cadena es plega sobre sí mateixa per donar lloc a una estructura d'uns 30nm de diàmetre que s'estabilitza per la histona H1. La fibra de cromatina s'estructura en una sèrie de bucles o nanses superenrotllades, que s'estabilitzen al interaccionar amb les proteïnes de la matriu nuclear. La fibra de 30nm, adopta un grau major d'empaquetament al voltant d'un eix que segueix un model en zig-zag (o de l'anglès two-start hèlix) en comptes de fer-ho al voltant d'un eix axial o *solenoid* (**Figura 20**) (Dorigo et al., 2004).

III. Introducció

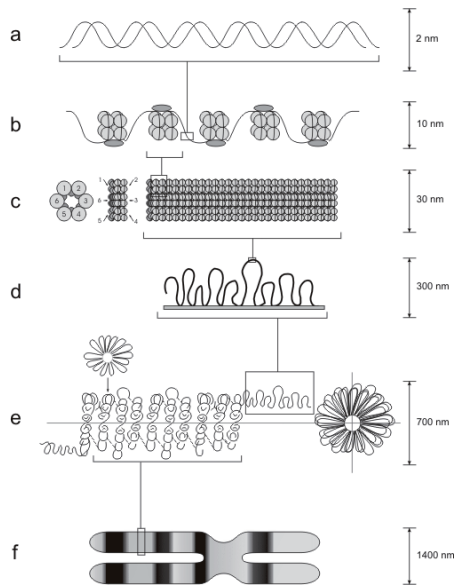


Figura 20. a. La doble cadena d'ADN **b.** Fibra polinucleosomal de 10nm **c.** La fibra de 10nm s'enrotlla al voltant d'un eix formant una fibra de 30nm **d.** Cada bucle de cromatina representa un domini funcional o unitat de replicació i s'estabilitzen gràcies a la interacció amb les proteïnes de la matriu nuclear. **e.** La fibra de 30nm s'organitza al voltant d'un eix fet zig-zag **f.** Durant la mitosi, la cromatina presenta la forma de màxima condensació, els cromosomes.

La cromatina apareix molt aviat en l'evolució per tal de solucionar els problemes dels eucariotes per empaquetar l'ADN dins al nucli (Slesarev et al., 1998). Històricament, la cromatina ha estat classificada entre heterocromatina, altament compactada i silent, i eucromatina descondensada i transcripcionalment activa. Actualment es considera que la cromatina és una macromolècula dinàmica que pot assumir un alt nombre de conformacions i on tenen lloc simultàniament multitud de processos com: la replicació, la reparació del dany, la formació del cinetocor, els centròmers, els telòmers, la regulació transcripcional entre altres.

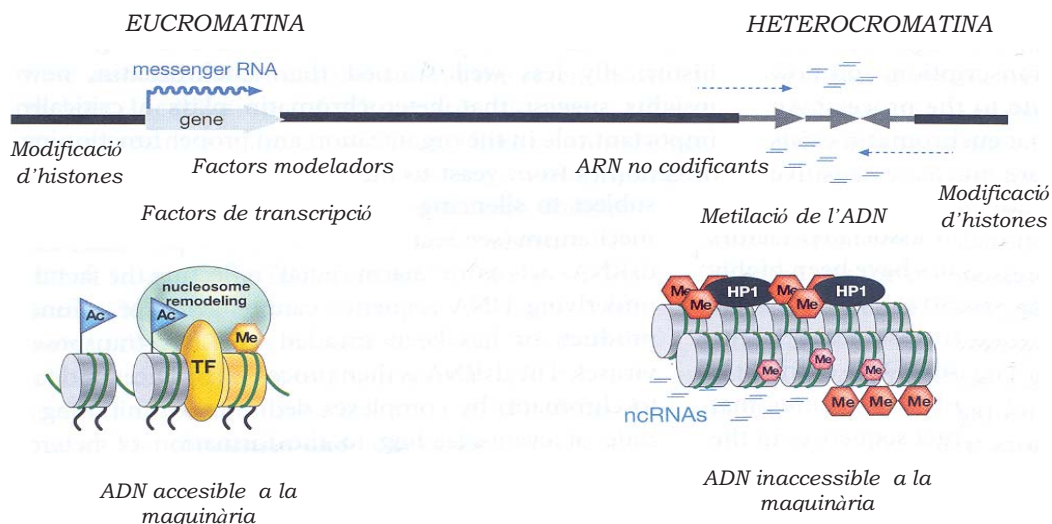


Figura 21. Diferències estructurals i funcionals entre la heterocromatina i eucromatina. Adaptat del llibre *Epigenetics*, CSHL, 2007

La cromatina confereix una estructura altament organitzada que permet ser interpretada per la maquinària transcripcional. Aquesta organització està formada per diferents components:

III. Introducció

- **Modificació postraduccional de les histones.** Cada histona que conforma el core té en el seu extrem amino terminal una regió que sobresurt de l'estructura del nucleosoma anomenada la *cua de la histona* (**Figura 23**). Aquesta regió està sotmesa a tot tipus de modificacions postraduccionalment com fosforilació, acetilació, metilació, entre altres controlant el grau de compactació de la cromatina (**Figura 21**) (Jenuwein & Allis, 2001; Zhang & Reinberg, 2001).

- La **posició del nucleosoma.** El core dels nucleosomes té certa flexibilitat de desplaçament al voltant de la regió de l'ADN que l'envolta. Canvis en la composició del nucleosoma poden permetre que l'ADN es separi del core augmentant l'accessibilitat de la regió a la maquinària transcripcional. Les cèl·lules disposen de mecanismes enzimàtics dependents d'ATP (per exemple SWI/SFI) que li permeten remodelar l'estructura del nucleosoma (Becker & Horz, 2002; Lin et al., 2007). La seva distribució al llarg de la seqüència no és aleatòria sinó que es concentren en les regions exòniques. En canvi, en les regions reguladores de l'*splicing* tenen una distribució més flexible suggerint un paper en el control de les isoformes (Tilgner et al., 2009).

- **La metilació de l'ADN.** L'addició d'un grup metil en la posició C⁵ dels residus de citosina dels dinucleòtids CpG, es considera un dels mecanismes epigenètics més importants en el silenciament de l'expressió gènica. Aquesta modificació permet estabilitzar la molècula d'ADN, defensar-la d'atacs de seqüències exògenes, interaccionar amb la bastida nuclear i el silenciament de l'expressió de certs gens (Ehrlich et al., 1982; Espada & Esteller, 2007; Keshet et al., 1986)

- **Les variants de les histones,** són histones (H3.3, H2AZ o H2A.X) que s'incorporen de forma independent a la replicació. Per exemple, les variants de la histona H2A, que són H2AX i H2AZ, s'incorporen i es fosforilen quan hi ha lesions en la doble cadena de l'ADN remodelant la conformació del nucleosoma (Ahmad & Henikoff, 2002; Smith et al., 2002).

- **L'ARN d'interferència (ARNi).** Són fragments d'ARN no codificant amb una seqüència complementària a la diana d'entre 21-30 nucleòtids. Aquests ARNs participen en diferents processos: en el manteniment i formació dels estats de l'heterocromatina en llevats; en mamífers, en l'imprinting, en els mecanismes de compensació de dosi (cromosoma X) i en el silenciament de

l'expressió gènica (Hall et al., 2002; Panning & Jaenisch, 1998; Rougeulle & Heard, 2002; Tufarelli et al., 2003).

- **L'arquitectura nuclear.** La cromatina té una morfologia i funció heterogènia organitzada a través dels seus compartiments subnuclears. Els principals són: els *territoris cromosòmics*, on es concentra una alta densitat gènica i, els *cossos nuclears*, on hi predomina la composició d'un tipus de proteïna. En són un exemple, el nucleol que és una regió de síntesi de ribosomes i els cossos de cajal, regió d'ensamblament de snRNP. Els factors de transcripció poden quedar segregats en aquestes regions i quedar a disposició de la maquinària transcripcional (Cremer & Cremer, 2001; Isogai & Tjian, 2003; Espada & Esteller, 2007).

L'alt grau d'empaquetament de la cromatina fa inaccessible l'ADN a la maquinària de transcripció i per tant, és una estructura essencialment repressora. Així doncs, l'expressió gènica necessita de la col·laboració dels mecanismes reguladors de la cromatina, dels enzims efectors i reguladors i dels factors de transcripció. La sinèrgia de tots aquests elements és el que permet formar el complex proteic capaç de regular de forma precisa l'expressió d'un gen.

3.2. Epigenètica

El terme **epigenètica** clàssicament es defineix com els canvis heredables a través de divisions mitòtiques i meiótiques que afecten a l'expressió gènica sense alterar el codi genètic (Riggs, 1975). La definició del terme ha estat en constant revisió. L'existència de modificacions epigenètiques transitòries i l'ambigüitat del terme "heredable" fan necessària una definició menys restrictiva del terme. Per aquests motius, A. Bird (A. Bird, 2007), ha proposat una definició més laxa on s'anomena epigenètica a: "l'adaptació estructural de les regions cromosòmiques per registrar, senyalitzar i perpetuar els estats alterats d'activitat", és a dir, l'estudi dels mecanismes de regulació que controlen la cromatina.

L'epigenètica va començar a sorgir com el component que permetia explicar les diferències interindividuals més enllà de la seqüència de l'ADN i la influència de l'ambient. Han estat fonamentals els estudis amb individus genèticament idèntics com: els *animals estabulats*, que ho han estat durant

III. Introducció

moltes generacions i es consideren isogènics; els estudis amb bessons *monozigòtics (MZ)*, que són clons naturals i els bessons *dizigòtics (DZ)*, que provenen de dos òvuls fecundats separatament.

Al 1990, *Gartner* va demostrar que l'ambient només justificava un 20% de la dispersió que trobava en variables com el pes de l'animal i el tamany del ronyó en les seves soques de ratolins estabulats. Gràcies al disseny d'un conjunt d'experiments, *Gartner* va anar aïllant el component responsable de l'aleatorietat, restringint les variables ambientals com l'ambient uterí i l'ambient postnatal. Aquests experiments, van demostrar que un 80% de les diferències fenotípiques que detectava no es podien explicar amb el model clàssic de gens/ambient. *Gartner* suggeria l'existència d'un tercer component que introduïa variabilitat al sistema (*Baunack et al., 1984; Gartner et al., 1990*).

Per altra banda, els estudis amb bessons MZ i DZ són una de les eines que s'utilitzen per establir la possible base genètica d'un caràcter. La discordància entre MZ ha estat fins ara, associada només a l'ambient. El treball de *Fraga M*, al 2005, ha posat en evidència que patrons epigenètics (distribució de la metilació i acetilació) de bessons MZ joves van divergint en funció de l'edat. Per tant, existeix una maquinària bioquímica que és sensible a les variacions de l'ambient i pot modificar el control de l'expressió gènica: el component epigenètic o epigenoma (*Fraga et al., 2005; Wong et al., 2005*).

L'envelliment produeix canvis no en la seqüència d'ADN sinó en l'epigenoma que la controla. Des de fa temps es coneix que hi ha una pèrdua de metilació a mesura que avança l'edat. Aquest fet s'ha demostrat *in vitro*, en cultius de fibroblast (*Wilson & Jones, 1983*), en animals estabulats (*Wilson et al., 1987*) i recentment, en els besons MZ (*Fraga et al., 2005*). Tot i així, sembla que la hipometilació afecta més a les zones repetitives com els elements transposables (*Barbot et al., 2002; Bestor & Tycko, 1996; Fraga et al., 2005*). Aquest fet, s'ha confirmat a través de l'estudi de *Eckhart 2006*. En aquest treball s'ha descrit que només un 17% dels 876 gens analitzats modifiquen la metilació en l'extem 5'UTR, i només una tercera part, ho reflecteixen a nivell de proteïna. Aquestes dades suggereixen que la metilació ontogènica sobre les regions gèniques és més estable del que s'esperava (*Eckhardt et al., 2006*). Hi ha canvis de metilació de gens específics : s'ha observat l'*hipermetilació* de gens en funció de l'edat, com per exemple: el receptor dels estrògens, el gen IGF i el MYOD, que és pràcticament indetectable de joves i comença a expressar-se

amb l'edat (Issa et al., 1994, 2000). A més, s'han descrit casos on alteracions de la dieta per falta de grups folat, produeix inestabilitat cromosòmica, defectes en el tub neural i hipometilació genòmica. Aquesta pèdua de grups metil pot produir un augment del càncer de fetge per hipometilació de c-ras, c-myc i c-fos (Blount et al., 1997; Dizik et al., 1991; Jacob, 1999). Poc a poc es va demostrant que no només la dieta pot afectar a la maquinària epigenètica sinó també el comportament matern i el tabac entre altres (von Zeidler et al., 2004; Weaver et al., 2004).

Les principals sistemes epigenètics que controlen l'expressió d'un gen són quatre: la metilació de l'ADN, la modificació de les histones, els ARN d'interferència i la posició dels nucleosomes (**Figura 22**).

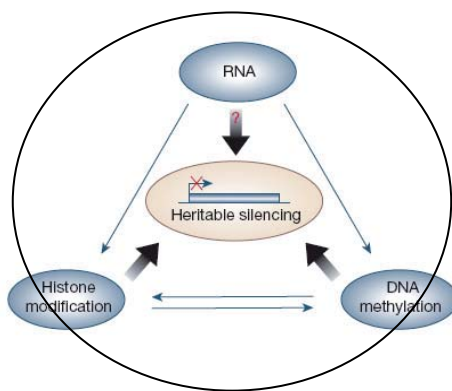


Figura 22. La modificació d'histones, el patró de metilació de l'ADN, l'acció dels ARN d'interferència i la posició dels nucleosomes permeten el silenciament genètic. [Adaptat de Egger, G. 2004]

Aquesta tesi es centrarà en la metilació de l'ADN i el paper dels factors de transcripció en la regulació transcripcional.

3.2.1. La modificació d'histones

Les histones són proteïnes altament conservades. S'han descrit proteïnes equivalents en el regne dels *Arqueobacteris*, on no només tenen funció d'empaquetament sinó també intervenen en la regulació gènica (Dinger et al., 2000). Les histones són proteïnes petites i bàsiques formades per dos dominis funcionals: un domini globular i flexible, i una regió poc estructurada anomenada "la cua de la histona" que sobresurt de la superfície del nucleosoma (**Figura 23**). Al formar l'octàmer, les histones en el core comparteixen un motiu estructural molt conservat anomenat *histone fold*, d'aproximadament 65 aa. L'*histone fold* està format per tres α -hèlix que li permeten estabilitzar el nucleosoma (Luger et al., 1997).

III. Introducció

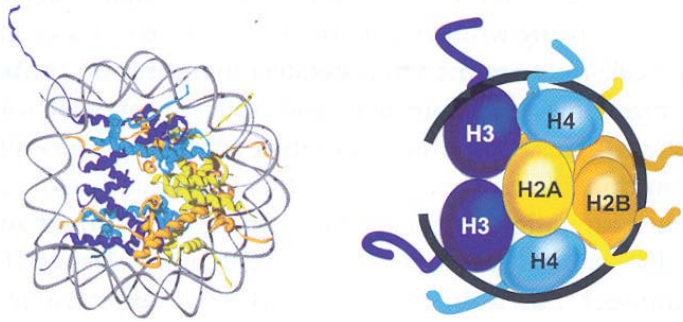


Figura 23. Estructura del nucleosoma (a l'esquerra) Model À de l'estructura del nucleosoma. (A la dreta) Representació de l'organització del nucleosoma. S'observen el domini globular i la cua de cada histona. Adaptat del llibre *Epigenetics*, CSHL, 2007.

Els extrems N-terminals són extremadament bàsics a causa de la proporció de lisines i arginines. Sobre aquesta regió tenen lloc la majoria de modificacions postraduccionalss essencials per la regulació de l'estructura de la cromatina i la seva funció (Jenuwein & Allis, 2001). S'han identificat i caracteritzat diferents tipus de modificacions covalents com són: fosforilació, ubiquitinització, sumoilació, ADP-ribosilació, biotinilació i la isomerització de la prolina. Aquestes acostument a tenir lloc en residus concrets i en diferents combinacions com s'observa a la **Figura 24**.



Figura 24. Llocs principals de modificació de la cua de les histones. En general les marques verdes són activadores i, les vermelles, repressores. Adaptat del llibre *Epigenetics*, CSHL, 2007.

Al 2000, Strahl, BD i els seus col·laboradors van postular l'**hipòtesi del codi** de les histones (Strahl & Allis, 2000). Aquesta hipòtesi proposa que les modificacions que es donen sobre les histones són reconegudes per un sistema de proteïnes que interpreten el codi i d'altres que l'escriuen. Per exemple, modificacions com l'acetilació es relacionen amb la activació transcripcional. Curiosament, la metilació de la lisina 36 de la histona 3 (*H3K36*) té un efecte

positiu sobre la transcripció si es troba en regions codificants i un efecte negatiu si es troba en regions promotores (Vakoc et al., 2005).

3.2.1.1. L'acetilació de les histones

L'acetilació és una modificació reversible que té lloc sobre els residus de les lisines (K) de les cues de les histones. Aquesta modificació està associada a la reparació de l'ADN i a regions transcripcionalment actives (Qin et al., 2002; Roh et al., 2005). Les K acetilades neutralitzen les càrregues negatives de l'ADN afeblint la relació entre l'histona i l'ADN o l'interacció nucleosoma-nucleosoma, fent accessible a la regió als factors de transcripció (Fletcher & Hansen, 1995; Norton et al., 1989; Steger & Workman, 1996).

Els enzims responsables de l'acetilació i la desacetilació dels residus de lisina són: *histones acetiltransferases* (HAT, *Histone acetyltransferase*) que transfereixen els grups acetil de l'acetil-coenzim A a un grup ϵ -amino de la lisina i les *histones deacetilases* (HDAC, *Histone Deacetylase*), que eliminen els grups acetil. Les **HAT** tenen com a substrat tant histones com factors de transcripció relacionats amb l'inici de transcripció. Es classifiquen en tres famílies: GNAT, MYST i CBP/p300 en funció de la homologia de la seqüència i els motius acetil-transferasa (Sternner & Berger, 2000). Per altra banda, les **HDAC** atenuen el procés de transcripció deacetilant cada lloc en particular. Aquests enzims es classifiquen en dos categories: les de tipus I (HDC 1, 2, 3 i 8) que regulen la seva activitat per la col·laboració amb altres proteïnes; les de tipus II (HDAC 4, 5, 6, 7 i 9) que es regulen via la subcompartimentació cel·lular. A més, el sistema HAT-HDAC s'ha proposat com un mecanisme associat a llocs específics de replicació i reparació de l'ADN. En condicions normals hi ha un equilibri entre les HAT/HDAC. Però en situacions de neurodegeneració, s'ha descrit una pèrdua generalitzada d'acetilació a les histones com a conseqüència de la pèrdua de específiques HAT. Aquest fet pot produir el col·lapse de la cromatina, impedit que els factors de transcripció entrin en contacte amb l'ADN. Per exemple: factors com CREB i NF- κ B necessiten grups acetil per dur a terme la seva funció (Anne-Laurence et al., 2007).

III. Introducció

3.2.1.2. La metilació de les histones

La metilació és una modificació que pot ser reversible i té lloc sobre les lisines (K) i arginines (R). El residu pot estar mono-, di- o tri- metilat i el seu efecte depèn tant del tipus d'aminoàcid modificat com del grau de metilació. Aquest tipus de modificació ha estat relacionada en la regulació transcripcional i en la compactació de l'heterocromatina.

S'han descrit diferents lisines metiltransferases i arginina metiltransferases classificades en funció de l'homologia de seqüència. Les principals posicions han estat: histona H3 (K4, K9, K27 i K79), la H4(K20) i la H2BK5 (Kouzarides et al., 2002). Seguint la teoria del codi de les histones, s'han observat certes modificacions associades a posicions activadores o repressores: la monometilació de H3K27, H3K9, H4K20, H3K79 i H2BK5 està relacionada amb l'activació gènica i per altra banda, trimetilacions de H3K27, H3K9 i H3K79 amb la repressió (Barski et al., 2007). Per exemple, H3K9 està relacionada amb el silenciament de la heterocromatina (Bannister et al., 2001).

3.2.2. La metilació de l'ADN

La metilació de l'ADN és l'addició d'un grup metil en la posició C⁵ en els dinucleòtids de CpG del genoma (Ehrlich et al., 1982). Evolutivament, la metilació de l'ADN és un mecanisme força conservat, tot i que varia la seva funció en cada organisme. En **procariotes**, la metilació té lloc en el C⁵ de l'adenina i actua com a mecanisme de defensa contra bacteris invasors. En els **eucariotes** la metilació és heterogènia: en *plantes i fongs filamentosos*, es produeix exclusivament sobre els transposons i seqüències repetitives simètriques CpG i CpNpG (on N es cualsevol nucleòtid) o asimètriques CpHpH (on H és C, Ao T) (A. Bird, 2002). En *mamífers*, en canvi, la metilació es troba repartida per tot el genoma afectant a un 70-80% dels dinucleòtids CpG. La distribució dels CpG metilats mostra un enriquiment en les regions no codificants i sobre els transposons i una falta de metilació sobre les illes CpG. La metilació de l'ADN té diferents funcions fisiològiques importants com són (Ehrlich et al., 1982):

- **Control de dosi gènica.** Els mamífers, per ser diploids, contenen dos dotacions gèniques una d'origen patern i una altre matern. Per la majoria de gens les dues còpies són funcionals però, hi ha una centena de gens que només utilitza un dels al·lels parentals que conté. L'*imprinting* és el mecanisme de control de la dosi de l'expressió

III. Introducció

d'aquests gens. També ocorre en la condensació *del cromosoma X* per part de les dones (Falls et al., 1999; Straub & Becker, 2007).

- L' **estabilització cromosòmica**. La metilació de l'ADN està enriquida en les regions *no codificants*, com les regions centromèriques i sobre els *transposons*, per evitar la desestabilització cromosòmica. El silenciament de seqüències *endoparàsites* prevenen a la cèl·lula de l'activació de gens que poden desencadenar tumors (A. P. Bird, 1986; Yoder et al., 1997; Walsh et al. 1998).
- El control de la **memòria cel·lular**. El grup de proteïnes del complex del Polycomb/trithorax en *Drosophila* i la metilació de l'ADN en mamífers han estat sistemes que s'han succeït al llarg de l'evolució. L'objectiu ha estat el manteniment de la memòria cel·lular, és a dir, mantenir un mateix patró de metilació en un mateix llinatge cel·lular (Birchler et al., 2000; A. Bird, 2002).
- **Control de l'expressió gènica**. En el genoma humà la proporció i distribució de dinucleòtids CpG no és aleatòria. Com a conseqüència d'un procés espontani de desaminació de l'ADN, els dinucleòtids metilats CpG redueixen la seva proporció i els no metilats s'enriqueixen (**Figura 25**). Les regions amb alta freqüència de dinucleòtids CpG s'anomenen *illes CpG*. Aquestes són regions al voltant de 500 parells de bases amb un contingut de GC d'aproximadament un 55% i no estan metilades a diferència de la resta de l'ADN. Han estat conservades durant l'evolució. Aquestes illes es situen en regions promotores al voltant d'un 40% dels gens dels mamífers i, si es metilen, causen el silenciament de l'expressió del gen (Takai & Jones, 2002; Gardiner-Garden & Frommer, 1987).

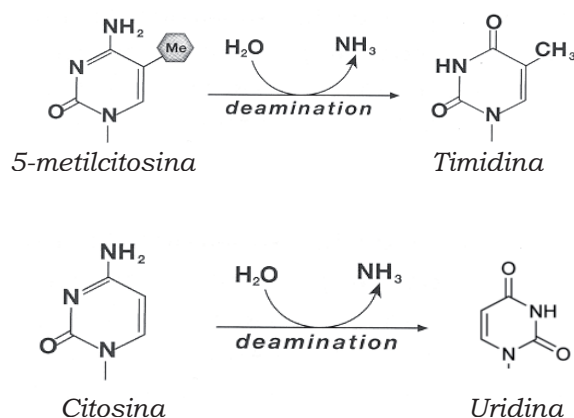


Figura 25. Deaminació: Procés de mutació espontani on una citosina metilada resulta en una timidina, i una citosina en un uracil. El mecanisme de reparació de l'ADN no reconeix l'uridina com a pròpia i la repara, no així amb la timidina. Les regions no metilades acumulen dinucleòtids CpG mentre que les metilades disminueixen la seva freqüència de dinucleòtids CpG. Adaptat del llibre *Epigenetics*, CSHL, 2007

III. Introducció

3.2.2.1. DNMT (ADN metiltransferases)

Les DNMT són els enzims encarregats de mantenir el patró de metilació en les diferents divisions cel·lulars. Aquests enzims catalitzen la transferència de grups metils des de la S-adenosil-L-metionina (SAM) fins a la posició 5 de la citosina. La família de les DNMT està formada per 5 proteïnes: DNMT1, DNMT2, DNMT3a i la DNMT3b i les DNMT3 anomenat DNMT3L (de DNMT3 like). Està establert que les DNMT3a i la DNMT3b són les responsables de la metilació de novo durant etapes tempranes del desenvolupament. Per altra banda, la DNMT1 és responsable del manteniment del patró d'expressió durant les divisions de les cèl·lules somàtiques (Hendrich & Bird, 2000). La pèrdua de l'habilitat de mantenir la metilació genera diferents malalties com ICF (Immunodeficiència per inestabilitat centromèrica) i abnormalitats facials. La metilació aberrant *de novo* sobre regions concretes dels promotors d'alguns gens altera el patró l'expressió en estadiatges primerencs en la carcinogènesi (A. Bird, 2002; P. A. Jones & Baylin, 2002).

3.2.2.2. Proteïnes d'unió a l'ADN metilat

La seqüència metilada de l'ADN és interpretada per una família de proteïnes que comparteixen un domini d'unió a l'ADN metilat (de l'anglès anomenat metil-CpG binding domain o MBD) (Ohki, I et al., 2001). Aquestes es classifiquen per homologia de seqüència i per la presència de MBD en: MeCP₂, MBD1, MBD2, MBD3 i MBD4. L'estudi dels dominis funcionals MBD ha mostrat poca homologia a excepció de MBD2 i MBD3 (**Figura 26**). Les proteïnes amb MBD (MeCP₂, MBD1 i MBD2) estan associades amb la repressió transcripcional i MBD3 forma part del complex corepressor NuRD (complex remodelador del nucleosoma i l'activitat HDAC (Ng et al., 1999; Zhang et al., 1999). La MBD4 s'ha proposat com proteïna que forma part del sistema de reparació de l'ADN (Jorgensen & Bird, 2002).

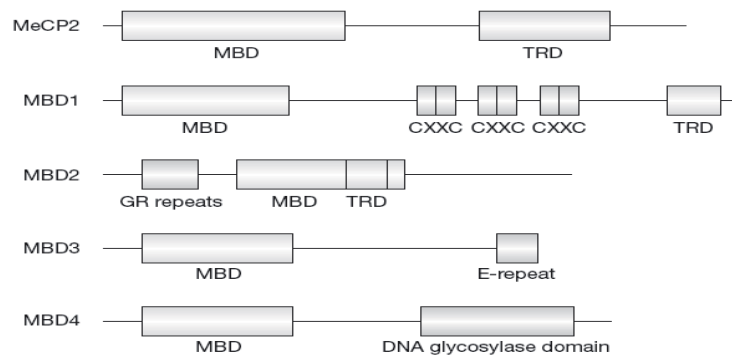


Figura 26. Representació esquemàtica des principals dominis de les proteïnes amb MBD. Els dominis TRD són de repressió transcripcional en MeCP2 i MBD1 i el domini (cxxx) és ric en citosines en MBD1. [Adaptat de l'article Sansom, O. Jet al., 2007]

La connexió entre la metilació de les histones i la metilació de l'ADN comença a dilucidar-se. Sembla que el mecanisme de silenciament gènic a partir de la metilació dels residus de les histones atrau a les proteïnes HP1, que són proteïnes d'ancoratge relacionades amb la heterocromatina. Aquestes, interaccionen amb les DNMT3 que metilen l'ADN. Aquesta modificació permet l'unió de les MBP, HDAC i metilases generant el colapso de la cromatina i la conseqüent repressió transcripcional (**Figura 27**) (Kouzarides et al., 2002, 2007; Nan X et al., 1998).

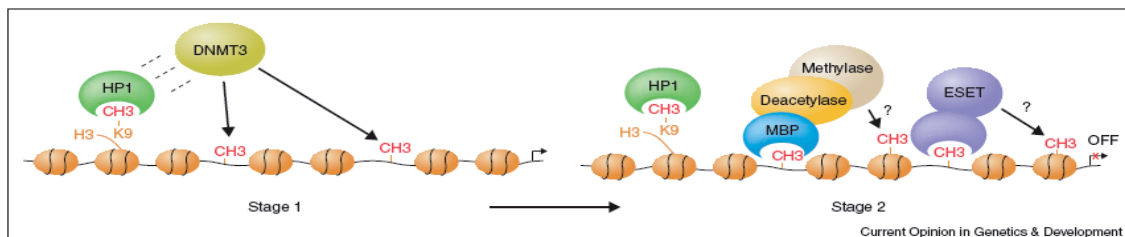


Figura 27. El model de com la metilació de l'ADN pot estar relacionat amb el procés de metilació d'histones. **Pas 1.** Les DNMT3 només poden actuar sobre els grups metil de la lisina 9. HP1 és una proteïna d'ancoratge als grups metils de les cues de les histones. **Pas 2.** Les MBP reconeixen l'ADN metilat, ajudant a reclutar HDAC i possiblement metilases. [Adaptat de Kouzarides, T et al., 2002]

III. Introducció

La **proteïna d'unió a grups CpG metilats 2** (MeCP2), és la proteïna amb MBD més estudiada i membre fundador d'aquesta família. El gen que codifica per MeCP2 es troba localitzat al cromosoma Xq28 i disposa de 4 exons. Aquest gen dona lloc a dos isoformes (MeCP2 β i MeCP2 α) per *splicing* alternatiu, en funció de la presència o absència de l'exó 2. MeCP2 β va ser la primera isoforma caracteritzada, tot i ser minoritària en els teixits. L'expressió majoritària és la isoforma MeCP2 α que en cervell de ratolí és d'un 90%. Ambdues formes són nuclears i colocalitzen amb l'heterocromatina en cèl·lules de ratolí (D'Esposito et al., 1996; Ballestar & Wolffe, 2001; Kriaucionis & Bird, 2004).

MeCP2 és un pèptid de 50KDa amb dos dominis funcionals principals: MBD, que permet reconèixer seqüències de l'ADN metilat *in vivo* i el domini de repressió transcripcional (de l'anglès TRD, que es troba entre els aminoàcids 207 i 310)(**Figura 26.B**). S'ha demostrat que MeCP2 reprimerix la transcripció com a mínim via dos mecanismes: a través d'una HDAC, on el domini TRD interacciona amb Sin3A (un co-repressor que forma un complex amb la HDAC); o via independent de HDAC, on el domini TRD interacciona amb TFIIB (Nan et al.,1997; Kaludov & Wolffe, 2000). Recentment també s'ha observat que MeCP2 s'uneix directament als gens que s'associen al activador transcripcional CREB1 (element de resposta a AMPc), presentant un paper activador (**Figura 28**) (Chahrour et al., 2008; Jones PL et al., 1998; Yasui et al., 2007).

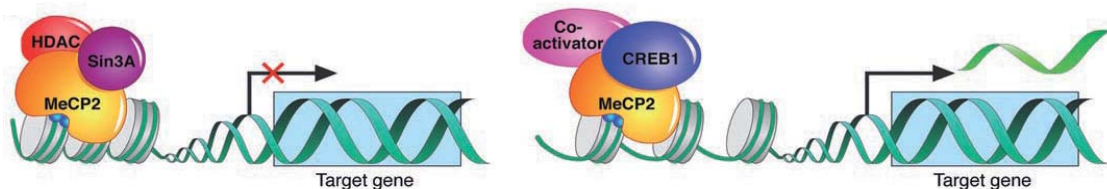


Figura 28. S'ha demostrat que el paper de MeCP2 és més complex del que semblava ja que pot actua com a mecanisme de repressió i activació gènica. Inhibeix l'expressió gènica a partir de la interacció amb Sin3A i HDAC i activant l'expressió dels gens que responen a increments d'AMPc via CREB1. [Adaptat de Chahrour, M. et al. 2008].

Un ampli espectre de mutacions en el gen del MeCP2 han estat identificades en el **Síndrome de Rett** (OMIM 312750), responsable del

1/10.000-22.000 dels casos de retràs mental en dones (Amir et al., 1999). És un síndrome exclusiu de dones ja que el homes amb mutacions no arriben a néixer. En canvi, les dones heterozigotes per aquesta mutació, inactiven de forma aleatòria un dels cromosomes X generant un patró de mozaisme per la proteïna mutada. Aquesta proteïna té una expressió ubiqüa en l'organisme, però s'ha observat que l'expressió a cervell és més abundant fet que justifica una major severitat de la simptomatologia (Jorgensen & Bird, 2002; Kriaucionis & Bird, 2003). Recentment, s'ha observat que es poden revertir els defectes neurològics dels models de ratolí amb síndrome de Rett, fins i tot, en animals adults (Guy et al., 2007).

3.2.3. Malalties neurodegeneratives i Epigenètica

S'han descrit alteracions en els mecanismes epigenètics com a responsables de diferents malalties i síndromes, inclosos càncer i desordres neurològics. Actualment aquest estudi s'està extenent a altres disciplines com són el neurodesenvolupament i les malalties neurodegeneratives (Urduingio et al., 2009). Els principals efectes són canvis en el patró de metilació de l'ADN (hipometilació/hipermetilació) i en les modificacions postranscripcionals de les histones. La seva identificació permetria considerar-los biomarcadors de la patologia o dianes de fàrmacs epigenètics.

A PD, com s'ha comentat anteriorment, hi ha una pèrdua neuronal progressiva de les neurones dopaminèrgiques i de projeccions estriatals causant rigidesa muscular, tremor, bradicinèsia i inestabilitat postural. S'han descrits canvis tant en el patró de metilació d'alguns gens com canvis en la modificació d'histones. Cal estudiar ara, si aquests canvis poden arribar a ser biomarcadors de la malaltia o dianes terapèutiques. Per exemple s'ha descrit que:

- La hipometilació del promotor del gen TNF-alfa pot contribuir a la *vulnerabilitat de les neurones de la substància nigra*. En aquest sentit s'ha observat que la sobreexpressió de TNF-alfa indueix apoptosi en cèl·lules neuronals. Cal destacar, que s'han detectat alts nivells d'aquesta citoquina en el fluid cerebrospinal de pacients de Parkinson (Mogi et al., 1996; Pieper et al., 2008).

III. Introducció

- L'efecte tòxic de l' α -sinucleïna nuclear està relacionat amb la seva associació amb Sirt2 i una HDAC, inhibint l'acetilació d'histones (Kontopoulos et al., 2006).
- La disminució de dopamina està associada a la pèrdua de H3K4me3, mentre que la teràpia amb levodopa crònica permet la deacetilació de les histones H4K5, K8, K12 i K16 de les neurones del nucli estriat (Nicholas et al., 2008).

Els principals tractaments epigenètics són: fàrmacs desmetilants i els inhibidors de les HDAC (HDACi). S'ha observat un rescat en el grau de toxicitat de l' α -sinucleïna en cèl·lules tractades amb ARNi contra Sirt2 i HDACi (com el butirat sòdic). D'aquesta manera protegeix dopaminèrgica in vitro i en un model de parkinson de *drosophila* (Outeiro et al., 2007; Urdinguio et al., 2009).

3.3. Els factors de transcripció

El rol dels factors de transcripció en la regulació de la funció cel·lular és indiscutible. Amb funcions de repressió i activació i/o modificadors de l'expressió gènica són necessaris per determinar quins gens, com i quan s'expressen en cada tipus cel·lular. Diferents evidències han demostrat que el mal funcionament de factors de transcripció poden conduir a alteracions cel·lulars, inestabilitat i, fins i tot, tumorigènesi. Els factors de transcripció mantenen una estreta coordinació amb altres proteïnes reguladores com: HAT, HDAC, les proteïnes amb MBD, per tal de controlar l'estat de condensació de la cromatina i dur a terme la seva funció.

La família de gens amb dominis amb dits de zinc (C2H2-ZNF) és una de les més abundants formada per 718 membres. Els primers membres van ser identificats a *Xenopus* (TFIIIA) i a *Drosophila* (Krüppel) i sovint es classifiquen com membres tipus TFIIIA o tipus *Krüppel*, en funció de la conservació de la seqüència d'aminoàcids que uneix els dits de zinc disposats en tàndem (Tadepally et al., 2008). Tant ZBP-89 com YY1, tenen quatre dits de zinc i són funcionalment multifuncionals, és a dir, poden activar o reprimir l'expressió gènica en funció del context cel·lular. Ambdós tenen un paper en la diferenciació, la proliferació, l'apoptosi i el càncer (He et al., 2008).

3.3.1. ZBP-89

El ZBP-89 (ZNF148, BFCOL1, BERF1) és un factor de transcripció de tipus krüppel, ubiqui i de 794 aa. Aquest factor de transcripció està codificat per un únic gen humà anomenat ZNF148 de 110Kbases localitzat al cromosoma 3q21(Law et al., 1998). Comparteix un 90% de la seqüència amb el seu homòleg de ratolí i conté nou exons.

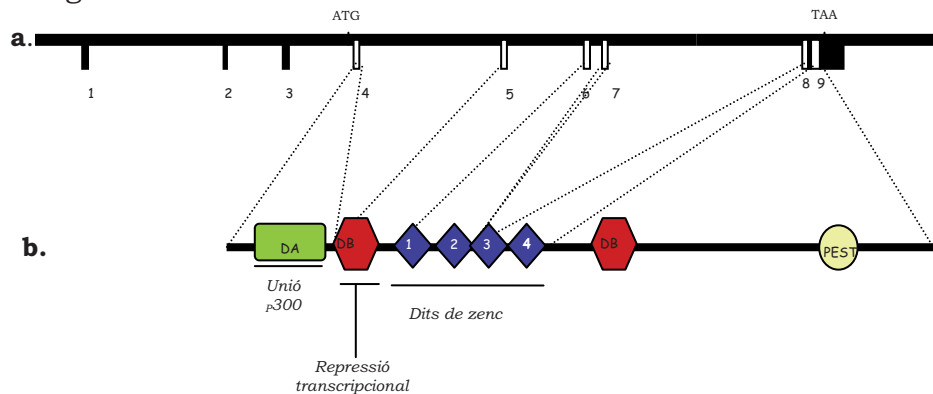


Figura 29 a. Organització del gen de ratolí *Ztp146* format per 9 exons on els quadrats negres són exons no codificants (Exons 1, 2 i 3) i els quadrats blancs són els exons codificats (Exons 4, 5, 6, 7, 8 i 9). **b.** Representació esquemàtica dels diferents dominis de la proteïna ZBP-89. Conté una regió rica amb aminoàcids àcids (DA), dos dominis bàsics (DB) flanquejant els quatre dits de zenc i un domini PEST que està relacionat amb la degradació pel proteasoma. [Adaptat de l'article Feo et al., 2001]

A nivell de proteïna, el ZBP-89 té un complex patró d'expressió que pot ser per una combinació entre l'*splicing* alternatiu, la presència de diferents promotors i de diferents llocs de poliadenilació (Feo et al., 2001). S'ha descrit una isoforma ZBP-89^{AN}, a la que li manquen els primers 127 aa perdent el lloc d'unió a p300/CBP, que predisposa a la colitis (Law et al., 2006). També s'han observat modificacions postranscripcionals com la sumoització i la fosforilació que poden afectar a la seva distribució i funcionalitat (Chupreta et al., 2007; Bai & Merchant, 2007). ZBP-89 té una expressió baixa i ubiqua tot i que, hi ha alguns teixits o tipus cel·lulars que contenen uns nivells més alts del factor de transcripció: els limfòcits T (Wang et al., 1993; Law et al., 1998; Reizis & Leder, 1999; Yamada et al., 2001; Law et al., 2006) el càncer gàstric (Taniuchi et al., 1997) el càncer de còlon (Law et al., 2006), l'adenocarcinoma hepàtic (HCC) (G. G. Chen et al., 2003) i als illots pancreàtics humans i murins i insulinomes humans (Bai et al., 2006).

III. Introducció

3.3.1.1. El paper funcional del ZBP-89

El ZBP-89 (ZNF148, Zfp148) és un factor de transcripció que interacciona amb regions riques en CG tant en la regió promotora com en enhancers regulant l'expressió de molts gens. Com molts altres factors de transcripció pot actuar com **activador** o com a **repressor** en funció del promotor i del tipus cel·lular. El ZBP-89 actua com a repressor, en general, competint amb un factor de transcripció activador anomenat Sp1. Ambdós sovint tenen solapats els llocs d'unió com és el cas la gastrina (Merchant et al., 1991, 1995, 1996). També pot tenir un paper d'activador, per exemple en processos de **diferenciació cel·lular**. Durant la miogènesi, gens que codifiquen per proteïnes musculars comencen a expressar-se mentre d'altres deixen de fer-ho. En aquest mecanisme intervé Sp1, que, unit a una HDAC1 controla negativament l'expressió de molts gens.

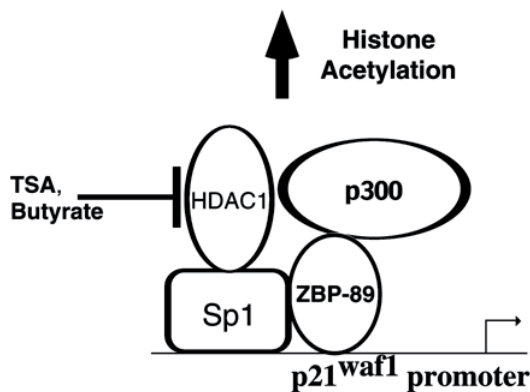


Figura 30. [Adaptat de l'article Bai,L. 2000]

Tot i l'ambient repressor, p21^{waf1} (una cinasa inhibidora de ciclines que atura el cicle cel·lular a G1) augmenta la seva expressió, aturant el cicle a G1, fet que permet la diferenciació cel·lular. El sistema de repressió via Sp1 necessita interaccionar amb p300 (una HAT) per induir l'expressió i això només ho pot fer a través de ZBP-89 (Doetzlhofer et al., 1999).

Aquest mateix mecanisme s'ha identificat en processos de desenvolupament del sistema nerviós.

3.3.2. Yin-Yang 1 (YY1)

El YY1 (δ , NF-E1, UCRBP i CF-1) és un factor de transcripció ubiqü de 414aa amb una seqüència homòloga als dits de zenc de tipus Krüppel. A més, pertany al grup de proteïnes de la família *Polycomb* (Gordon et al., 2006). Les proteïnes d'aquesta família estan associades als processos de manteniment de la repressió transcripcional durant el desenvolupament. YY1 és homòleg al gen

Pleiohomeotic (PHO) de *Drosophila* que s'ha demostrat que pot reclutar proteïnes PcG in vivo permetent la deacetilació de la H3 i la metilació en la lisina 27 formant complexos estables de repressió (Atchison et al., 2003; Wilkinson et al., 2006; Srinivasan et al., 2005). El gen que codifica per YY1 en humà s'anomena amb el mateix nom i està localitzat al cromosoma 14q22.2 (Yao et al., 1998). Pel que fa a la seva estructura gènica, està compost per 5 exons altament conservats i dos promotors que generen 8 trànscripats diferents (a-h) per *splicing* alternatiu, dels quals no es coneix funció. L'estructura proteica del YY1 està formada per cinc dominis diferents que li confereixen tant activitat repressora com activadora de l'expressió gènica (**Figura 31**).



Figura 31. Estructura proteica de YY1 està formada per dos regions àcídiques, una rica amb histidines, una regió rica amb glicina i alanina (GA) i una regió rica amb glicina i lisina (GK) i quatre dits de zenc. Funcionalment els dominis que li permeten actuar com a repressor són (298-397) i (157-201) en el C-terminal i el domini (43-53) en l'extrem N-terminal actua com activador. [Adaptat de l'article Shi.Y. et al. 1997]

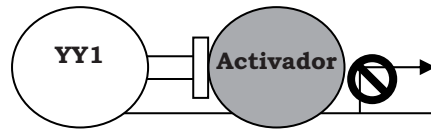
S'han identificat dos possibles membres de la família del YY1: YY2 i REX-1. Adues proteïnes comparteixen majoritàriament el fragment dels dits de zenc tot i que, la resta no presenta homologia (Nguyen et al., 2004). La funció de YY1 està regulada a través de multitud de paràmetres que inclouen la localització subcel·lular, modificacions postraduccionals com la fosforilació i l'unió a altres proteïnes.

3.3.2.1. El paper funcional del YY1

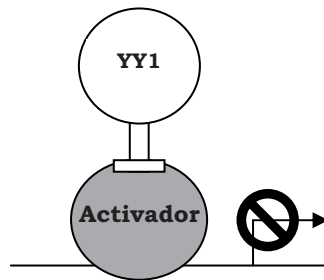
El YY1 intervé en la repressió i l'activació transcripcional a través de múltiples mecanismes:

1. Model on YY1 *inhibeix directament l'activació transcripcional*. Tot i la presència d'un factor activador en la regió promotora, YY1 reprimeix la transcripció situant-se fins i tot a certa distància del factor activador. Un exemple és el promotor del gen *c-fos* on YY1 té dos llocs d'unió.

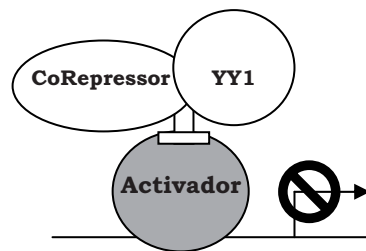
III. Introducció



2. El YY1 pot *mediar la inhibició d'un gen interaccionant directament amb el factor de transcripció activador*. El YY1 interfereix en l'acció del factor de transcripció activador. Un exemple és el gen *c-fos*, on CREB actua d'activador transcripcional. El YY1 interacciona amb CREB mitjançant el domini de dits de zinc, bloquejant l'expressió de *c-fos* (Guo et al., 1997).



3. La tercera estratègia és a *través d'un cofactor*. Per exemple s'ha descrit que YY1 pot interaccionar amb HDAC1/2 i amb MeCP2, permetent-li regular la compactació de la cromatina (Nan et al., 1998; M. J. Thomas & Seto, 1999).



Cada cop és més complicat simplificar els mecanismes d'acció dels factors de transcripció assignant l'adjectiu de repressor/activador. Sembla que hi ha una gran flexibilitat de funcions depenent dels elements que intervinguin i és la suma de tots ells els que determinen un balanç positiu o negatiu de l'expressió del gen.

IV. Objectius

IV. Objectius

1. *Caracterització dels receptors d'adenosina i la seva transducció de senyal en la malaltia dels grans argiròfils.*
2. *Caracterització del receptor d'adenosina A_{2A} en el putamen de pacients amb la malaltia de Parkinson sense tractament farmacològic.*
3. *Estudi epigenètic del gen ADORA2A in vitro i en el putamen de pacients amb la malaltia de Parkinson sense tractament farmacològic.*
4. *Caracteritzar el paper dels factors de transcripció ZBP-89 i YY1 en l'expressió del gen ADORA2A.*

V. Resultats Publicats

V. Resultats Publicats

1. Perez-Buira S., Barrachina M., Rodriguez A., Albasanz J.L., Martín M. and Ferrer I. (2007) **Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease.** *Neurosci. Lett.* 423, 194-199

2. Albasanz, J.L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., Martín, M., 2008. **Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease.** *Brain Pathol.* 18, 211-219

3. Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I and Barrachina M. **DNA methylation regulates adenosine A2A receptor cell surface expression levels.** *J Neurochem*

1. L'expressió dels receptors d'adenosina en l'hipocamp i el còrtex frontal en la malaltia de grans argiròfils.

S. Perez-Buira, M. Barrachina, A. Rodriguez, J.L. Albasanz, M. Martín, I. Ferrer.

La malaltia de grans argiròfils és una taupatia de tipus 4R. La seva principal marca histopatològica és la presència de tau hiperfosforilat en el citoplasma de les neurones en forma de pre-capdell i en els processos neuronals formant grans argiròfils. Les principals àrees afectades són la regió entorrinal, la CA1 hipocampal, amígdala i altres regions del sistema límbic. En la majoria de casos el còrtex frontal no presenta afectació. L'adenosina és un nucleòsid de purina que juga un paper en la majoria de processos cel·lulars tant en condicions fisiològiques com en condicions patològiques. L'adenosina duu a terme la seva activitat a través de quatre receptors acoblats a proteïna G: A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 on els A_1 i A_3 inhibeixen l'adenilat ciclasa i els A_{2A} i A_{2B} l'activen. L'objectiu d'aquest treball va ser concloure l'estudi descriptiu dut a terme en el nostre grup sobre l'expressió dels receptors d'adenosina en diferents malalties neurodegeneratives. Vam caracteritzar el perfil d'expressió dels receptors d'adenosina en la regió hipocampal (regió afectada) i en la regió cortical (sense afectació) i vam mesurar el grau d'afectació de la via de senyalització. Els nivells d'expressió dels receptors i de l'adenilat ciclasa (AC) es van estudiar per western blot i el grau de sensibilització de la via, mitjançant el percentatge d'inhibició per l'agonista. Es va observar un increment del receptor A_1 i de la AC en la regió hipocampal però no dels receptors A_{2A} i A_{2B} . A més, hi ha es va detectar un increment, tot i que no significatiu, del percentatge d'inhibició de l'activació de l'AC per forskolina, al afegir un agonista del receptor A_1 . Com a conclusió, aquestes dades indiquen que la via de senyalització del receptor A_1/AC està alterada en la regió hipocampal dels pacients amb la malaltia de grans argiròfils, probablement com a mecanisme neuroprotector.



Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease

S. Perez-Buira^a, M. Barrachina^a, A. Rodriguez^a, J.L. Albasanz^b, M. Martín^b, I. Ferrer^{a,*}

^a Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, carrer Feixa Llarga sn, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain

^b Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Químicas, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

Received 8 May 2007; received in revised form 24 June 2007; accepted 25 June 2007

Abstract

Expression of adenosine receptors of the A1, A2A and A2B type has been examined in the post-mortem frontal cortex and hippocampus in argyrophilic grain disease (AGD), a tauopathy affecting the hippocampus but usually not the frontal cortex, in an attempt to learn about the modulation of the adenosine pathway in this disorder. Significant increased levels of A1, but not of A2A and A2B, have been observed in AGD in the hippocampus but not in the frontal cortex, when compared with age-matched controls. This is accompanied by increased levels of adenylyl cyclase (AC), an effector of A1, and by increased (although not significant) percentage of inhibition of forskolin-stimulated AC by the A1 agonist cyclohexyladenosine in the hippocampus in AGD. These findings indicate sensitization of A1/AC in the hippocampus in AGD, and support a putative activation of the A1/AC pathway that may facilitate protection of this preferentially involved region in AGD.

© 2007 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Argyrophilic grain disease; Adenosine receptors; Adenylyl cyclase

Argyrophilic grain disease (AGD) is a late-onset neurodegenerative disease, producing cognitive impairment and dementia, which is morphologically characterized by the presence of abundant spindle-shaped argyrophilic grains in neuronal processes and coiled bodies in oligodendrocytes, especially in the entorhinal and perirhinal cortices, CA1 region of hippocampus, amygdala and other regions of the limbic system. The neocortex and, particularly, the frontal cortex, are not morphologically affected [5,14,19]. The main biochemical abnormality is the deposition of hyper-phosphorylated tau 4R in the cytoplasm of neurons (usually in the form of pre-tangles) and in the neuropil grains, as well as in oligodendrocytes and certain astrocytes in vulnerable brain regions [21,22,25]. Hyper-phosphorylation of tau is accompanied by selective over-expression of tau kinases in sensitive cell populations [11]. The reasons for cellular degeneration are not known but it may be assumed that injuring mechanisms are combined with compensatory responses to reduce cell damage.

Adenosine is involved in the regulation of different metabolic processes under differing physiological and pathological conditions and mediates its function through the adenosine receptors (ARs) [10,16,23]. A1 and A3 mediate inhibition of adenylyl cyclase (AC) activity through G_{ai}-proteins, and A2A and A2B mediate stimulation of AC activity through G_{as}-proteins [13]. In addition, stimulation of A1 activates phospholipase C, phospholipase D and several types of K⁺ channels, and inhibits Ca²⁺ currents [16]. A1 type receptors are found in several tissues [9], but they are enriched in the CNS, where they are mostly expressed in the cerebral cortex, hippocampus, cerebellum, thalamus and brain stem. In the brain, adenosine modulates neuronal activity by decreasing pre-synaptic release of various neurotransmitters [3,12,23]. The most dramatic inhibitory actions are on the glutamatergic system [10].

Based on these findings, and in an attempt to learn about adenosine receptors in AGD, the present study used western blotting to analyze the expression of ARs in the frontal cortex and hippocampus in AGD. Protein studies were accompanied by *in vitro* assays of AC activity using A1 agonists.

Brain samples were obtained from the Institute of Neuropathology brain bank following the guidelines of the local ethics committee. The brains of five patients with AGD (three

* Corresponding author. Tel.: +34 93 260 7452; fax: +34 93 260 7503.
E-mail address: 8082ifa@comb.es (I. Ferrer).

Table 1
Summary of cases

Case	Age	Gender	p-m delay	Diagnosis
1	62	F	4	Control
2	63	M	17	Control
3	46	F	20	Control
4	73	F	5	Control
5	87	F	5	AGD
6	64	F	9	AGD + ADIII
7	77	F	3	AGD + ADIV
8	72	F	10	AGD
9	65	F	4	Control
10	79	M	7	Control
11	73	F	7	Control
12	71	F	20	AGD

F: female; M: male; p-m delay: post-mortem delay (in hours); AGD: argyrophilic grain disease; AD: Alzheimer's disease stage of Braak; control: no neurological and metabolic disease, and no neuropathological findings.

pure AGD and two AGD with Alzheimer's disease stage III and IV) and four age-matched controls were obtained from 3 to 20 h after death and prepared for morphological and biochemical studies. Age-matched controls ($n=7$) had no neurological or metabolic abnormalities, and the neuropathological examination was strictly normal including lack of neurofibrillary tangles and amyloid plaques. A summary of cases is found in Table 1. At autopsy, one hemisphere was cut into coronal sections, rapidly frozen on dry ice and stored at -80°C until use. The other hemisphere was fixed in 4% buffered formalin for 2–3 weeks, and selected samples were embedded in paraffin and processed for morphological study. In addition, samples of the frontal cortex (area 8) and hippocampus were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h, cryoprotected with 30% saccharose, and frozen.

Cryostat sections, 15- μm thick, were processed free-floating. Rabbit polyclonal antibodies to A1 (Oncogene, Barcelona, Spain), A2A (Chemicon, Millipore, Barcelona, Spain) and A2B (Abcam, Cambridge, UK) were used at dilutions of 1:1000, 1:500 and 1:500, respectively. The peroxidase reaction was visualized with NH_4NiSO_4 (0.05 M) in phosphate

buffer (0.1 M), 0.05% diaminobenzidine, NH_4Cl and 0.01% hydrogen peroxide (dark blue precipitate). Some sections were incubated without the primary antibody. No immunoreactivity was found in these samples.

Immunohistochemistry disclosed A1, A2A and A2B immunostaining in the frontal cortex and hippocampus restricted to neurons, in control and diseased cases. No evidence of immunoreaction in grains was noted in AGD (Fig. 1).

Plasma membrane extracts of the frontal cortex (area 8) and hippocampus were obtained for study. Tissue samples were homogenized in a buffer containing 20 mM Hepes, 0.25 M sucrose, 0.3 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 mM EGTA, and 1 mM MgCl_2 (pH 7.4), and centrifuged at $600 \times g$ for 10 min. The supernatants were centrifuged at $48,000 \times g$ for 20 min. The pellets were re-suspended in a buffer containing 20 mM Hepes, 0.3 mM PMSF and 1 mM DTT (pH 7.4), and centrifuged in the same way. Membrane-enriched pellets were re-suspended in the same buffer and stored at -80°C until use. Protein concentration was measured with the BCA method using bovine serum albumin (BSA) as a standard. For Western blots, 10 μg of protein was mixed with loading buffer containing 0.125 M Tris (pH 6.8), 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 4% SDS and 0.002% bromophenol blue. Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5–12% SDS-PAGE) was carried out using a mini-protean system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with molecular weight standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes which were washed with TTBS containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl and 0.1% Tween-20, blocked with TTBS containing 5% skimmed milk. Then the membranes were incubated with one of the primary antibodies at 4°C overnight. The rabbit polyclonal anti-A1 (Oncogene) was used at a dilution of 1:1000; the rabbit polyclonal anti-A2A (Chemicon) was used at a dilution 1:500; the rabbit polyclonal anti-A2B (Abcam) was used diluted 1:500; and the rabbit polyclonal anti-AC1 (Santa Cruz Biotechnology, Madrid, Spain) was used at a dilution of 1:1000. After rinsing, the membranes were incubated with the corresponding anti-rabbit secondary antibody (Dako, Madrid, Spain) at a dilution

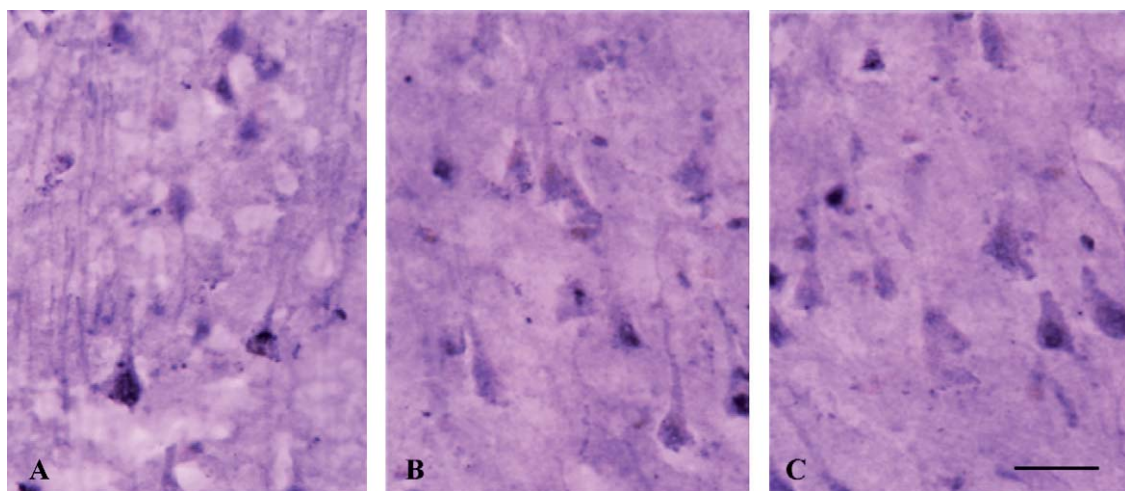


Fig. 1. Immunoreactivity to A1 (A), A2A (B) and A2B (C) in the hippocampus in AGD brain. Immunoreactivity is found in neurons but no evidence of immunostaining occurs in neuropil grains. Thick section processed free-floating. Bar = 25 μm .

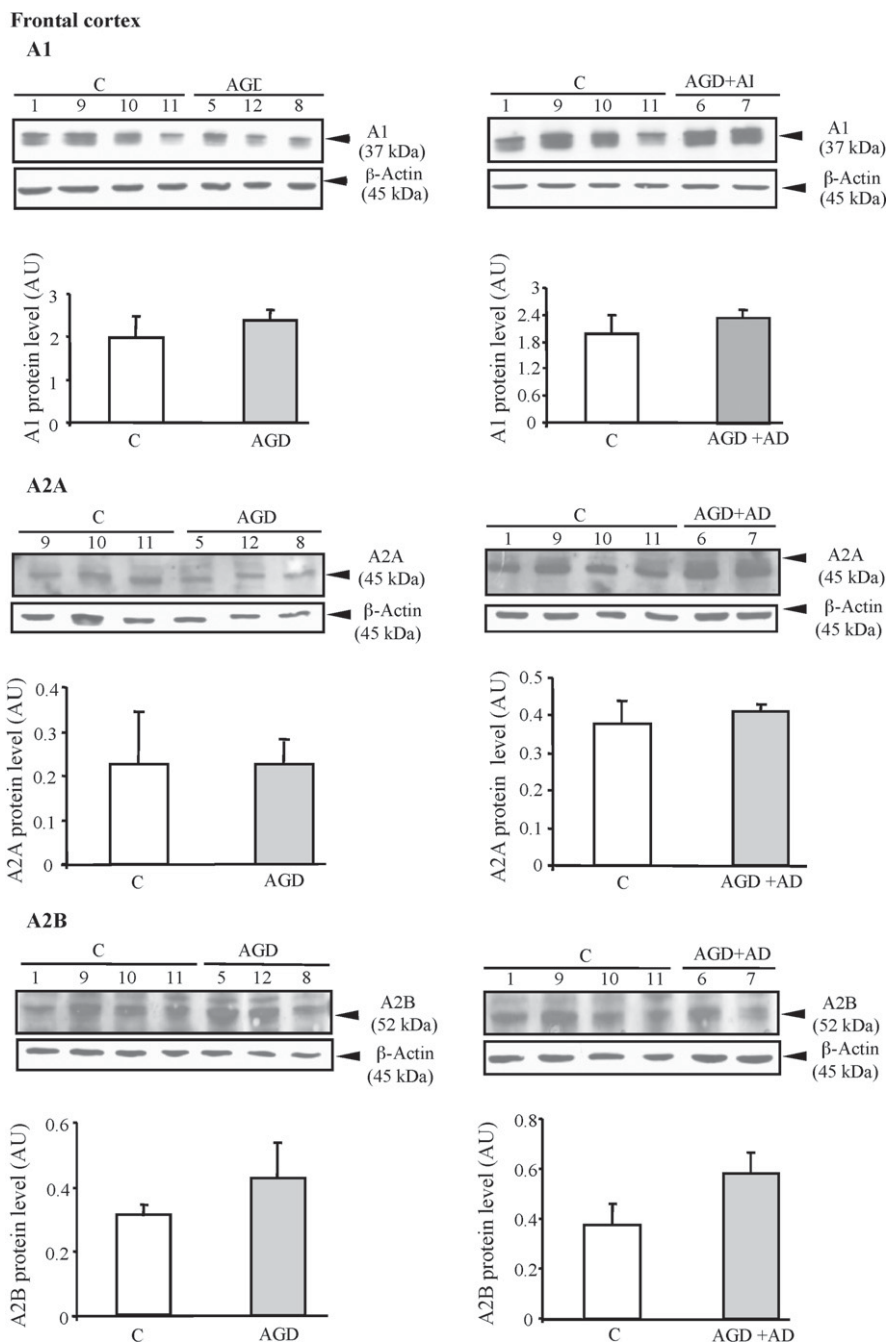


Fig. 2. Western blots to A1, A2A and A2B in the frontal cortex showing a double band of 37 kDa corresponding to A1, one band of 45 kDa corresponding to A2A and one band of 52 kDa corresponding to A2B in control and diseased cases. No differences in the density of bands of A1, A2A and A2B immunoreactivity are seen between control and diseased cases. Accompanying graphs show no differences between AGD-only (5, 12, 8) and AGD + AD (6,7) cases. AU: arbitrary units.

of 1:1000. The immunoreaction was visualized with the ECL chemiluminescence detection Kit (Amersham, Madrid, Spain), and the specific bands were quantified by densitometry using Total Laboratory v2.01 software. The monoclonal antibody to β -actin (Sigma, Madrid, Spain), at a dilution of 1:30,000, was used as a control of protein loading. Densitometric studies were normalized with β -actin. The numerical data obtained from diseased cases and the corresponding controls were statistically analyzed using STATGRAPHICS plus 5.0 software from ANOVA and the LSD statistical tests. Asterisks indicate the following p values: (*) $p < 0.05$.

AC activity was determined in plasma membranes as previously described [18]. Plasma membranes were first incubated with adenosine deaminase (ADA, 5 U/mg protein) at 37 °C for 30 min in order to remove endogenous adenosine. Assay was performed with 20 μ g of protein in a final volume of 250 μ l of 50mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 1 mg/ml creatine kinase, 10 mM creatine phosphate and 0.1 mM Ro 20-1724 (a phosphodiesterase inhibitor). Plasma membranes were incubated at 37 °C for 6 min in the absence (basal activity) or in the presence of 5 μ M GTP γ S, and 50 or 100 μ M forskolin. A1R/AC functionality was deter-

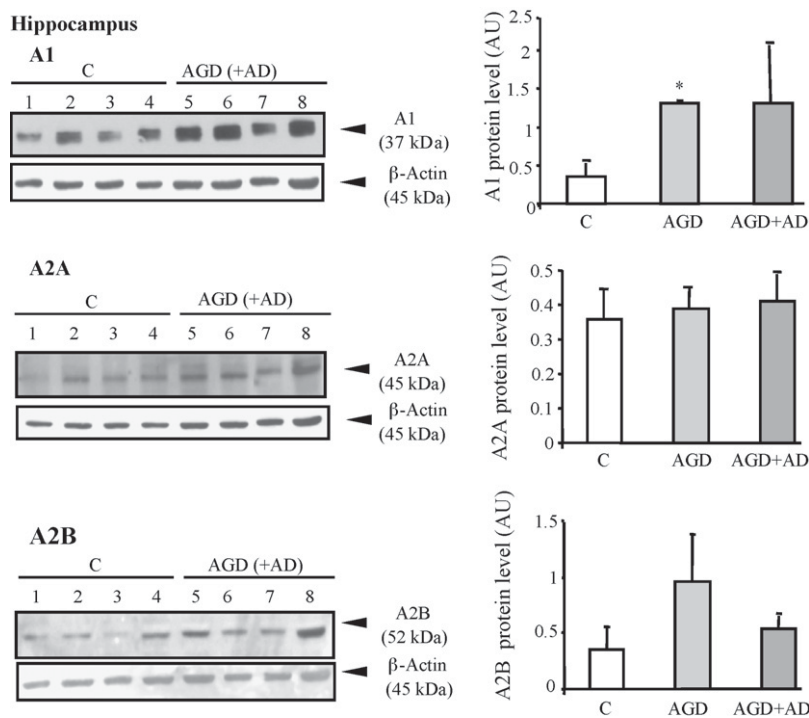


Fig. 3. Western blots to A1, A2A and A2B in the hippocampus in control and diseased cases. No differences in the density of A2A and A2B are seen in AGD cases when compared with controls. However, increased A1 immunoreactivity is found in AGD cases. Accompanying graphs include all control and AGD-only cases (5, 8, 12), and all control and two AGD + AD (6, 7) cases. Differences are significant ($*p < 0.05$) in the AGD hippocampus when compared with age-matched controls. AU: arbitrary units.

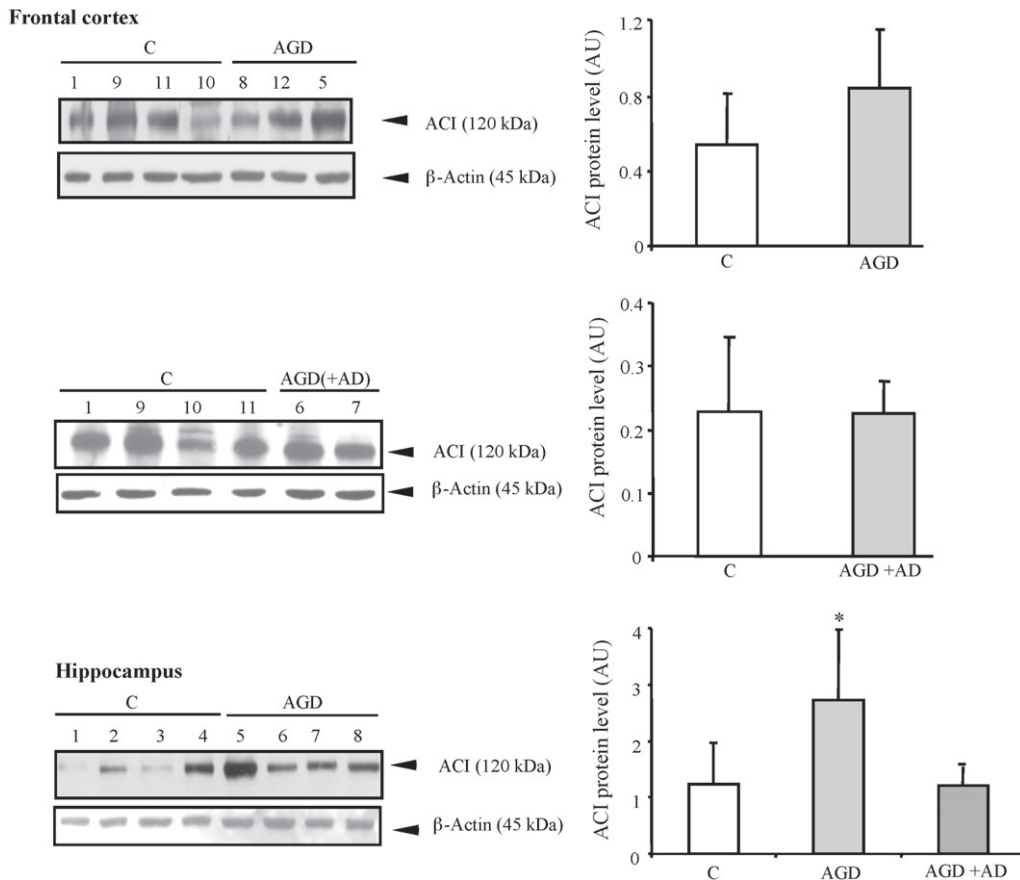


Fig. 4. Western blots to AC showing a unique band of 120 kDa corresponding to AC in control and diseased cases in the frontal cortex and hippocampus. Accompanying graphs include all control and AGD cases, and show that differences are significant ($*p < 0.05$) in the AGD-only, but not in AGD + AD, hippocampus when compared with age-matched controls. Differences between controls and diseased cases are not seen in the frontal cortex. AU: arbitrary units.

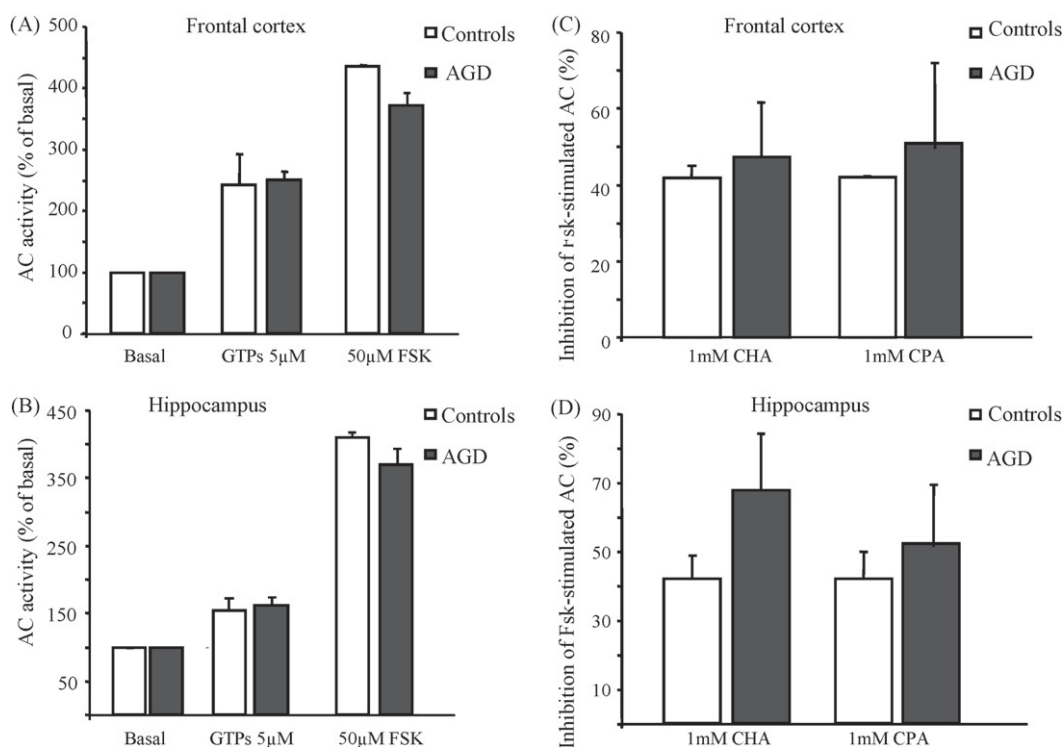


Fig. 5. Adenylyl cyclase (AC) activity in the frontal cortex (A) and hippocampus (B) in control and AGD (AGD-only: 5, 8, 12) cases. cAMP levels detected by the cAMP enzyme immunoassay kit *in vitro* are expressed as the percentage of AC basal activity in the presence of 5 µM GTPγS and 50 µM forskolin (Fsk). No significant differences in AC activity are seen between AGD and control cases. Inhibitory effects on adenylyl cyclase (AC) activity in the presence of the A₁ agonists CHA or CPA on 50 µM forskolin-stimulated AC activity in the frontal cortex (C) and hippocampus (D), expressed as the percentage of AC inhibition, show a higher, although not significant, percentage of inhibition with CPA in AGD when compared with controls.

mined in the presence of 1 mM CPA (*N*⁶-cyclopentyladenosine) and 1 mM CHA (cyclohexyladenosine), used as specific A₁Rs agonists. The reaction was started by adding 200 µM ATP and continued with incubation at 37 °C for 10 min while shaking. The reaction was stopped by boiling the samples. This was followed by centrifugation at 12,000 × *g* for 5 min. Fifty microliters of the supernatant was used to determine cAMP accumulation. cAMP concentration was determined by using the cAMP enzyme immunoassay kit (Assay Designs, Inc., Bionova, Madrid) following the instructions of the supplier. The resulting plates were examined with a plate reader at 405 nm. Results were analyzed with GraphPad Prism and Microsoft Excel. All the experiments were carried out in triplicate.

Expression levels of A1 in the frontal cortex, characterized by a double-band of 37 kDa, were similar in control and AGD brains. Expression levels of A2A (45 kDa) and A2B (52 kDa) in the frontal cortex were also similar in control and diseased cases. Moreover, no differences were seen between AGD only (cases 5, 8 and 12, Table 1) and AGD + AD (cases 6 and) in relation to controls (Fig. 2).

However, a significant increase ($p < 0.05$) in the levels of A1 was found in the hippocampus of AGD-only (5, 8, 12, Table 1) cases when compared with controls (Fig. 3). Individual variations in AGD + AD cases resulted in non-significant differences with corresponding controls. In contrast, no differences in the hippocampal levels of A2A and A2B were seen between control and diseased brains (Fig. 3).

Finally, a significant increase ($p < 0.05$) in the level of AC (120 kDa) was found in the hippocampus, but not in the frontal cortex in AGD brains (Fig. 4).

Basal AC activity in the hippocampus and frontal cortex was approximately of the same order in the frontal cortex in AGD (cases 5, 8 and 12) and controls (117 pmol/mg of protein/min), and also approximately of the same order in the hippocampus in AGD and controls (115 pmol/mg of protein/min) (Fig. 5). Based on these data, values were normalized to 100% in every case. However, differences were seen following the addition of the A₁ agonist CHA in the cAMP production in a forskolin (fsk)-stimulated AC system in the hippocampus but not in the frontal cortex. Increased inhibition of Fsk-stimulated AC was found in the presence of 1 mM CHA. This increase represented raised A1 levels of about 70%. Yet, they were not significant because of individual variations in the samples (Fig. 5).

The present findings show increased expression levels of A1 and AC in the hippocampus, a region vulnerable to AGD, whereas A1 and AC are not abnormally expressed in frontal cortex, a region usually preserved in AGD. In contrast, no apparent differences in the expression levels of A2A and A2B occur in the frontal cortex and hippocampus in this disease, thus suggesting that the increase is specific to A1. Therefore, abnormal expression of A1 and AC are related with regional vulnerability in AGD. Although not significant, because of individual variations, the trend of decreased forskolin-stimulated cAMP production in response to the A₁ agonist CHA further suggests sensitization of A1s in the hippocampus in AGD.

Early studies showed loss of human hippocampal A1 in AD and sclerosis-type pathology, thus suggesting that loss of A1 in dementia was not specific to AD-type pathology [8]. Yet recent studies have not reproduced these findings. Increased expression of A1 has been reported in AD and CJD [2,18]. Differences may be related to the use of total homogenates or plasma membrane extracts in the different studies. Immunohistochemical studies have shown increased A1 immunoreactivity in dendritic processes surrounding amyloid plaques [2], whereas this particular localization does not apply to CJD and AGD because of the absence of senile plaques in those cases.

Previous studies have also shown reduced AC expression and activity in AD brains [20,24]. However, AC expression and activation are increased in CJD and related prionopathies [18]. The present findings further suggest differences between AD and AGD in relation to AC expression.

Expression of adenosine receptors in the cerebral cortex in different pathology states is poorly documented. Up-regulation of A2 has been observed in Pick's disease [1], but little is known as to whether these changes are also present in other diseases. The present findings have shown that, in contrast to Pick's disease, there is no evidence of modifications in the levels of A2A and A2B in the frontal cortex and hippocampus in AGD.

The present observations may have practical implications. It has been documented that activation of adenosine type 1 receptors produces neuronal depression, thus permitting tolerance and protection from several noxious stimuli, including ischemia, neurotoxins, trauma and apoptotic factors [4,6,7,17]. This effect is not limited to neurons, as endogenous adenosine has cardioprotective effects mediated by A1 [15]. Increased expression of A1 and AC in the hippocampus in AGD supports a putative activation of this pathway and, therefore, increased capacity to protect this vulnerable region in AGD.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI05/1570; PI05/1631), and grants 04/301-01 and 04/301-02 from the Fundació 'La Caixa'. We thank T. Yohannan for editorial help.

References

- [1] J.L. Albasanz, A. Rodriguez, I. Ferrer, M. Martin, Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex, *Brain Pathol.* 16 (2006) 249–255.
- [2] E. Angulo, V. Casado, J. Mallol, E. Canela, F. Vinals, I. Ferrer, C. Lluís, R. Franco, A1 Adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer's disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation, *Brain Pathol.* 13 (2003) 440–451.
- [3] E. Arrigoni, D.G. Rainnie, R.W. McCarley, R.W. Greene, Adenosine-mediated presynaptic modulation of glutamatergic transmission in the laterodorsal tegmentum, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1076–1085.
- [4] D. Blum, D. Gall, M.C. Galas, P. d'Alcantara, K. Bantubungi, S.N. Schiffmann, The adenosine A1 receptor agonist adenosine amine congener exerts a neuroprotective effect against the development of striatal lesions and motor impairments in the 3-nitropropionic acid model of neurotoxicity, *J. Neurosci.* 22 (2002) 9122–9133.
- [5] H. Braak, E. Braak, Argyrophilic grain disease: frequency of occurrence in different age categories and neuropathological diagnostic criteria, *J. Neural Transm.* 105 (1998) 801–819.
- [6] I. D'Alimonte, P. Ballerini, E. Nargi, S. Buccella, P. Giuliani, P. Di Lorio, F. Caciagli, R. Cicarelli, Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A(1) adenosine receptor activation, *Neurosci. Lett.* 418 (2007) 66–71.
- [7] A. Dalpiaz, S. Manfredini, Adenosine A(1) receptor: analysis of the potential therapeutic effects obtained by its activation in the central nervous system, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 1923–1937.
- [8] J. Deckert, F. Abel, G. Kunig, J. Hartmann, D. Senitz, H. Maier, G. Ransmayr, P. Riederer, Loss of human hippocampal adenosine A1 receptors in dementia: evidence for lack of specificity, *Neurosci. Lett.* 244 (1998) 1–4.
- [9] A.K. Dixon, A.K. Gubitza, D.J. Sirinathsinghji, P.J. Richardson, T.C. Freeman, Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, *Br. J. Pharmacol.* 118 (1996) 461–468.
- [10] T.V. Dunwiddie, S.A. Masino, The role and regulation of adenosine in the central nervous system, *Annu. Rev. Neuroscience* 24 (2001) 31–55.
- [11] I. Ferrer, M. Barrachina, M. Tolnay, M.J. Rey, N. Vidal, M. Carmona, R. Blanco, B. Puig, Phosphorylated protein kinases associated with neuronal and glial tau deposits in argyrophilic grain disease, *Brain Pathol.* 13 (2003) 62–78.
- [12] B.B. Fredholm, T.V. Dunwiddie, How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol. Sci.* 9 (1988) 130–134.
- [13] B.B. Fredholm, A.P. Izzerman, K.A. Jacobson, K.N. Klotz, J. Linden, International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol. Rev.* 53 (2001) 527–552.
- [14] K.A. Jellinger, Dementia with grains (argyrophilic grain disease), *Brain Pathol.* 8 (1998) 377–386.
- [15] T.J. Mader, J.J. Menegazzi, A.E. Betz, E.S. Logue, C.W. Callaway, L.D. Sherman, Adenosine A1 receptor antagonism hastens the decay in ventricular fibrillation waveform morphology during porcine cardiac arrest, *Resuscitation* 71 (2006) 254–259.
- [16] V. Ralevic, G. Burnstock, Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 413–492.
- [17] J.A. Ribeiro, What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4 (2005) 325–329.
- [18] A. Rodríguez, M. Martín, J.L. Albasanz, M. Barrachina, J.C. Espinosa, J.M. Torres, I. Ferrer, Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine PrP mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (2006) 964–975.
- [19] Y. Saito, N.N. Ruberu, M. Sawabe, T. Arai, N. Tanaka, Y. Kakuta, H. Yamanouchi, S. Murayama, Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (2004) 911–918.
- [20] A. Schnecko, K. Witte, J. Bohl, T. Ohm, B. Lemmer, Adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease brain: stimulatory and inhibitory signal transduction pathways are differentially affected, *Brain Res.* 644 (1994) 291–296.
- [21] T. Togo, N. Sahara, S.H. Yen, N. Cookson, T. Ishizawa, M. Hutton, R. de Silva, A. Lees, D.W. Dickson, Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61 (2002) 547–556.
- [22] M. Tolnay, N. Sergeant, A. Gheseem, S. Chalbot, R.A. De Vos, E.N. Jansen Steur, A. Probst, A. Delacourte, Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms, *Acta Neuropathol.* 104 (2002) 425–434.
- [23] M.C. Wittendorp, J. Von Frijtag Drabbe Künzel, A.P. Izzerman, H.W. Boddeke, K. Biber, The mouse brain adenosine A1 receptor: functional expression and pharmacology, *Eur. J. Pharmacol.* 487 (2004) 73–79.
- [24] M. Yamamoto, M.E. Gotz, H. Ozawa, C. Luckhaus, T. Saito, M. Rosler, P. Riederer, Hippocampal level of neural specific adenylyl cyclase type I is decreased in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1535 (2000) 60–68.
- [25] V. Zhukareva, K. Shah, K. Uryu, H. Braak, K. Del Tredici, S. Sundarraj, C. Clark, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, Biochemical analysis of T proteins in argyrophilic grain disease, Alzheimer's disease, and Pick's disease, *Am. J. Pathol.* 161 (2002) 1135–1141.

2. Els nivells d'expressió dels receptors d'adenosina estan augmentats en el còrtex frontal de la malaltia d'alzheimer.

José L. Albasanz, PhD; Sandra Perez; Marta Barrachina, PhD; Isidro Ferrer, MD PhD; Mairena Martín, PhD

Els receptors d'adenosina són receptors acoblats a proteïna G classificats en A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 en funció del grau d'afinitat pel seu agonista endogen, l'adenosina. Els receptors A_1 i A_3 interaccionen amb l'adenilat ciclase (AC) inhibint la seva activitat i els receptors A_{2A} i A_{2B} activant-la. El receptor d'adenosina A_1 (A_1R) té un paper clàssicament neuroprotector i els antagonistes del receptor d'adenosina A_{2A} (A_{2AR}) també han demostrat reduir la neurotoxicitat del pèptid β -amiloid *in vitro* i *in vivo*. La malaltia d'alzheimer és la major causa de demència a partir dels 60 anys. La seva principal marca histopatològica són els agregats de tau hiperfosforilat en el citoplasma de les neurones i les plaques de pèptid B-amiloid a l'espai extracel·lular. L'objectiu d'aquest estudi va ser conèixer els nivells d'expressió dels receptors d'adenosina així com la seva via de transducció de senyals. Es van analitzar els nivells d'expressió i l'activitat d' A_1R i A_{2AR} per western blot i per assaig d'unió a radiolligant. També es van determinar els nivells proteics i l'activitat de l'adenilat ciclase (AC). Els nivells de ARNm es van estudiar per qPCR. El resultat demostren que hi ha un increment dels receptors A_1R i A_{2AR} i de la seva activitat en estadis inicials de la malaltia sense observar canvis en la progressió de la malaltia. En canvi, no es va observar un augment en els seus nivells d'ARNm. Per altra banda, tot i no detectar un augment en els nivells d'expressió de l'AC, hi ha un augment en el percentatge d'inhibició de la via afegint agonistes específics dels dos receptors, demostrant una sensibilització d'aquesta via a AD. En conclusió, el treball demostra que ja en estadis primerencs de la malaltia, on el còrtex frontal encara no presenta lesió histopatològica, hi ha un increment dels receptors A_1R i A_{2AR} , el qual es manté durant el desenvolupament de la patologia juntament amb una sensibilització de la seva via de transducció de senyal.

RESEARCH ARTICLE

Up-regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease

José L. Albasanz, PhD¹; Sandra Perez²; Marta Barrachina, PhD²; Isidro Ferrer, MD^{2,3}; PhD; Mairena Martín, PhD¹

¹ Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Químicas, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain.

² Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

³ Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, campus de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Keywords

Alzheimer's disease, adenosine receptors, adenylyl cyclase.

Corresponding author:

Mairena Martín, PhD, Área de Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Avenida Camilo José Cela, 10, 13071 Ciudad Real, Spain (E-mail: Mairena.Martin@uclm.es)

Received: 12 July 2007; revised 27 September 2007; accepted 5 October 2007.

doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x

Abstract

Adenosine receptors are G-protein coupled receptors which modulate neurotransmitter release, mainly glutamate. Adenosine A₁ and A_{2A} receptors were studied in post-mortem human cortex in Alzheimer's disease (AD) and age-matched controls. Total adenosine A₁ receptor number, determined by radioligand binding assay, using [³H]DPCPX, was significantly increased in AD cases in early and advanced stages without differences with the progression of the disease. A significant increase of A₁R (37 kDa) levels was also observed by Western blot in early and advanced stages of AD. In addition, increased numbers of adenosine A_{2A} receptors were observed in AD samples as determined by a binding assay using [³H]ZM 241385 as a radioligand and by Western blot. Increased binding and protein expression levels of adenosine receptors were not associated with increased mRNA levels coding A₁ and A_{2A} receptors. Finally, increased A₁ and A_{2A} receptor-mediated response was observed. These results show up-regulation of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in frontal cortex in AD, associated with sensitization of the corresponding transduction pathways.

INTRODUCTION

Adenosine receptors are G-protein coupled receptors which have been classified into A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ receptors. A₁ and A₃ receptors inhibit adenylyl cyclase through Gi/o proteins, while A_{2A} and A_{2B} receptors stimulate adenylyl cyclase through Gs proteins (16, 25). The endogenous ligand of these receptors is adenosine, which is widely distributed in both the central and the peripheral nervous systems. Adenosine is a neuromodulator and neuroprotective metabolite (13). Adenosine and drugs with effects on adenosine receptors may help to inhibit the progressive neurodegenerative process in dementia (28). However, the implications of adenosine A₁ and A_{2A} receptors in neuroprotection appear to be different. While agonists of A₁ receptors have been widely considered as neuroprotectors, it has recently been observed that pharmacological blockade or gene disruption of adenosine A_{2A} receptors confers neuroprotection. Caffeine, a non-specific antagonist, has shown neuroprotection to β-amyloid (Aβ) neurotoxicity in cultured neurons of rats (11) and mice (5, 12).

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia in the elderly. It is characterized by a progressive deterioration in memory and cognitive functions. The characteristic hallmarks of AD include senile plaques, mainly composed of Aβ peptide, neurofibrillary tangles, and selective synaptic and neuronal loss in

several brain regions, including the cerebral cortex (7, 29). Previous studies have shown modifications of Adenosine A₁ and A_{2A} receptors in AD. Most of these studies were carried out in the hippocampus and striatum, and they have shown reduced adenosine A₁ receptors in these areas (14, 18, 20, 32). However, little is known about adenosine A₁, and even less about A_{2A} receptors in the frontal cortex in AD in relation to the progressive stages of AD pathology. Therefore, the aim of the present work was to analyze adenosine A₁ and A₂ receptors and their inhibitory and stimulatory coupling, respectively, to adenylyl cyclase activity in brains from AD patients. Results have shown up-regulation and sensitization of A₁ and A_{2A} receptors in the frontal cortex in AD as an early event of disease progression.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine,8-[dipropy-2,3-³H(N)] ([³H]DPCPX 120 Ci/mmol) and [³H]adenosine 3', 5'-cyclic phosphate ([³H]cAMP 27.4 Ci/mmol) were from PerkinElmer (Madrid, Spain) and [2-³H](4-(2-[7-amino-2(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol) ([³H]ZM 241385 27.4 Ci/mmol) from Tocris (Bristol, UK). Anti-A₁ antibody was from

Oncogene (Cambridge, MA) and anti-adenylyl cyclase I (ACI) antibody was from Santa Cruz (Madrid, Spain). Guanosin triphosphate was purchased from Roche (Barcelona, Spain). Calf intestine adenosine deaminase (ADA), forskolin, 2-[4-[(2-carboxyethyl)phenyl]ethylamino]-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (CGS 21680), N⁶-cyclohexyladenosine (CHA), theophylline and N⁶-cyclopentyladenosine (CPA) were from Sigma (Madrid, Spain). All other reagents were of analytical grade and obtained from commercial sources.

Tissue samples

Brain samples were obtained from the brain banks of the Institute of Neuropathology and the University of Barcelona-Clinic Hospital following the guidelines of the local ethics committees. The brains of patients with AD and age-matched controls were obtained from 3 to 24 h after death and were immediately prepared for morphological and biochemical studies. Although agonal state seems not to affect adenylyl cyclase measurements (8), cases with prolonged agonal state were not considered suitable for the present study. At autopsy, half of the brain was fixed in formalin, while the other half was cut in coronal sections 1 cm thick, frozen on dry ice and stored at -80°C until use. The neuropathological study was carried out on formalin-fixed, de-waxed 4-µm thick paraffin sections of the frontal (area 8), primary motor, primary sensory, parietal and temporal superior, temporal inferior, anterior cingulate, anterior insular, and primary and associative visual cortices; entorhinal cortex and hippocampus; caudate, putamen and pallidum; medial and posterior thalamus; subthalamus; Meynert nucleus; amygdala; midbrain (two levels) pons and medulla oblongata; and cerebellar cortex and dentate nucleus. The sections were stained with hematoxylin and eosin, Luxol fast blue-Klüver Barrera, and for immunohistochemistry to glial fibrillary acidic protein, CD68 and *Licopericum esculentum* lectin for microglia, Aβ, tau, αB-crystallin, α-synuclein and ubiquitin. AD-related pathology was categorized following the proposal of Braak and Braak (7). The cases from the present study were used for the study of metabotropic glutamate receptors in cerebral cortex in AD (2). The main clinical and neuropathological characteristics are summarized in Table 1. No neurological or neuropathological abnormalities were observed in control cases.

Plasma membrane isolation

Plasma membranes from brain samples were isolated as described previously (10). Samples were homogenized in 20 volumes of isolation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 10 mM MgCl₂ and protease inhibitors) in Dounce homogenizer (10 × A, 10 × B). After homogenization, brain preparations were centrifuged for 5 minutes at 1000g in a Beckman JA 21 centrifuge. Supernatant was centrifuged for 20 minutes at 27 000g and the pellet was finally resuspended in isolation buffer. Protein concentration was measured by the method of Lowry *et al* (23), using bovine serum albumin as a standard.

[³H]DPCPX binding assays to plasma membranes

Binding assays to plasma membranes were performed as described previously (22). Plasma membranes were incubated with 5 U/mg

ADA in 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, pH 7.4, for 30 minutes at 25°C, in order to eliminate endogenous adenosine from membrane preparations. Then, plasma membranes (50–75 µg of protein) were incubated with [³H]DPCPX for 2 h at 25°C. Saturation assays were carried out at different [³H]DPCPX concentrations (0.1–20 nM) using CPA at a concentration 10⁵ times higher than the radioligand, in order to obtain non-specific binding. Binding assays were stopped by rapid filtration through Whatman GF/B filters, preincubated with 0.3% polyethylenimine, and then immediately washed three times with 4 mL ice-cold buffer. Filters were then counted in a Microbeta Trilux (Perkin Elmer) liquid scintillation counter.

[³H]ZM 241385 binding assays to plasma membranes

Binding assays were performed as previously described (3). Plasma membranes were incubated with 5 U/mg ADA in 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.4, for 30 minutes at 25°C, in order to eliminate endogenous adenosine from membrane preparations. Then, plasma membranes (100 µg of protein) were incubated with [³H]ZM 241385 for 2 h at 25°C. Saturation assays were carried out at different [³H]ZM 241385 concentrations (0.5–50 nM) using 5 mM theophylline to obtain non-specific binding. As in the case of A₁R, binding assays were stopped by rapid filtration through Whatman GF/B filters, and then immediately washed and transferred to vials to count the radioactivity.

Adenylyl cyclase activity assay and determination of cAMP levels

Adenylyl cyclase activity was determined in brain plasma membranes as previously described (3) with several modifications. The assay was performed with 15–20 µg of protein in a final volume of 0.25 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, 1 mg/mL creatine kinase, 10 mM creatine phosphate and 0.1 mM Ro 20-1724 (specific phosphodiesterase inhibitor). Plasma membranes preincubated with ADA (5 U/mg protein), in order to remove endogenous adenosine, were incubated at 37°C for 15 minutes with 5 µM guanosine-5'-O(3-thiotriphosphate) tetralithium salt (GTPγS), 50 µM forskolin, 1 mM CHA or 1 mM CGS21680. The reaction was started by the addition of 200 µM ATP and incubation at 37°C for 10 minutes. The reaction was stopped by boiling the samples which were then centrifuged at 12 000g for 4 minutes. Twenty microliters of supernatant was used to determine cAMP accumulation. Samples were incubated with 0.25 pmol [³H]cAMP and 6.25 µg PKA in a final volume of 200 µl of buffer assay (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 4 mM EDTA) for 2–8 h at 4°C. Standard samples (0–16 pmol) were prepared in the same buffer. The reaction was stopped by rapid filtration through Whatman GF/B filters, followed by washing with ice-cold buffer. Filters were then counted in a Microbeta Trilux (Perkin Elmer) liquid scintillation counter.

Western blot assays

For Western blot assays, 30 µg of protein was mixed with loading buffer containing 0.125 M Tris (pH 6.8), 20% glycerol, 10% β-mercaptoethanol, 4% SDS and 0.002% bromophenol blue, and heated at 95°C for 5 minutes. Sodium dodecylsulphate-

Table 1. Summary of the main clinical and neuropathological data in the present series. Abbreviations: M = male; F = female.

Case number	Gender	Age	p-m delay	Lewy stage	NFT stage	β -amyloid stage
1	M	82	11	0	0	0
2	F	63	7	0	0	0
3	M	76	10	0	0	0
4	M	80	11	0	0	0
5	F	79	7	0	0	0
6	F	80	3	0	0	0
7	F	65	4	0	0	0
8	M	71	12	0	0	0
9	M	78	2	0	0	0
10	M	80	13	0	I	A
11	F	85	12	0	I	B
12	M	59	7	0	I	B
13	F	73	15	0	I	0
14	M	78	6	0	II	B
15	F	76	9	0	II	B
16	F	81	6	0	II	B
17	M	74	24	0	II	B
18	M	74	4	0	III	B
19	F	74	5	0	III	0
20	M	72	3	0	III	0
21	F	81	14	0	III	B
22	M	85	14	0	IV	B
23	F	82	5	0	IV	C
24	M	79	5	0	V	B
25	M	93	7	0	V	C
26	F	78	19	0	V	C
27	M	69	6	0	V	C
28	F	86	10	0	V	C
29	M	69	20	0	V	C
30	F	82	10	0	V	C
31	M	85	8	0	VI	C

Lewy stage corresponds to staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. NFT stage refers to neurofibrillary degeneration staging in Alzheimer's-disease-related (AD) pathology, whereas β A-amyloid stage refers to AD amyloid deposition following the classification of Braak and Braak (7). Stages I–II correspond to entorhinal, III–IV to limbic and V–VI to isocortical NFTs. Stage A indicates amyloid deposition in the basal neocortex, stage B indicates cortical association areas affected, and stage C indicates involvement of the whole isocortex.

polyacrylamide gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) was carried out using a mini-protean system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with molecular weight standards (Bio-Rad) with molecular weight standards. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes which were washed with TTBS containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl and 0.1% Tween-20, blocked with TTBS containing 5% skimmed milk, and then incubated with the primary antibodies at 4°C overnight. The rabbit polyclonal anti-A₁R and anti-A_{2A}R (Oncogene, Barcelona, Spain) were used at a dilution of 1:500. The rabbit polyclonal anti-ACI (Santa Cruz Biotechnology, Madrid, Spain) was used at a dilution of 1:1000. After rinsing, the membranes were incubated with the corresponding anti-rabbit secondary antibody (Dako, Madrid, Spain) at a dilution of 1:1000. The immunoreaction was visualized with the enhanced chemiluminescence detection Kit (Amersham, Madrid, Spain), and the specific bands were quantified by densitometry using Total Laboratory v2.01 software (Amersham, Madrid, Spain). The monoclonal antibody to β -actin (Sigma, Madrid, Spain), at a dilution of 1:30 000, was used as a control of protein loading. Densitometric studies were normalized with β -actin.

mRNA isolation

mRNA isolation was carried out using the Qiagen RNeasy lipid tissue (Qiagen) mini Kit following the instructions provided by the manufacturer. The concentration of each sample was obtained from A₂₆₀ measurements. RNA integrity was tested by the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent). Only RNAs with a RIN number above 6.5 were selected for TaqMan PCR assay.

cDNA synthesis

The retrotranscriptase reaction (100 ng RNA/ μ L) was carried out by using the high capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) following the protocol provided by the supplier. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of MultiScribe Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA.

TaqMan probes

Human β -glucuronidase (GUS) (Hs99999908_m1, TaqMan probe 5'-GACTGAACAGTCACCGACGAGAGTG-3'), human β -actin (Hs99999903_m1, TaqMan probe 5'-TCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCGT-3'), human A₁R (Hs00379752_m1, TaqMan probe 5'-GATCCCTCTCCGGTACAAGATGGTG-3') and human A_{2A}R (Hs00169123_m1, TaqMan probe 5'-CCGCTCCGGTACAATGGCTTGGTGA-3') were examined in the present study. The TaqMan assay for GUS is located between 11 and 12 exon boundary, at position 1816 of NM_000181.1 transcript sequence. The predicted amplicon size is about 81 base pairs. The TaqMan assay for β -actin is located in the 5' UTR region at position 36 of NM_001101.2 transcript generating an amplicon of 171 base pairs. The TaqMan assay for A₁R is located between 5 and 6 exon boundary, at position 752 of NM_000674.1 transcript, generating an amplicon of 111 base pairs. The TaqMan assay for A_{2A}R is located between 1 and 2 exon boundary, at position 614 of NM_000675.3 transcript, generating an amplicon of 66 base pairs.

TaqMan PCR

TaqMan PCR assays for every gene were performed in duplicate on cDNA samples in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The plates were capped using optical caps (Applied Biosystems). The ABI Prism 7900 measures the fluorescent accumulation of the PCR product by continuously monitoring cycle threshold (Ct), which is an arbitrary value assigned manually to a level somewhere above the baseline but in the exponential phase of PCR where there are no rate-limiting components. The Ct value sets the point at which the sample amplification plot crosses the threshold. The Ct values correlate with the initial amount of specific template. For each 20 μ L TaqMan reaction, 9 μ L cDNA (diluted 1/20, which corresponds approximately to the cDNA from 45 ng of RNA) was mixed with 1 μ L 20 \times TaqMan Gene Expression Assays and 10 μ L of 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Parallel assays for each sample were carried out using primers and probes with β -actin and GUS for normalization. The reactions were carried out using the following parameters: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 minute. Standard curves were prepared for A₁R, A_{2A}R, β -actin and GUS using serial dilutions of control human brain RNA. Finally, all TaqMan PCR data were captured using the Sequence Detector Software (SDS version 1.9, Applied Biosystems, Madrid, Spain).

Statistical and data analysis

The binding data were analyzed with the GraphPad Prism 4.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The numerical data obtained from diseased cases and the corresponding controls were statistically analyzed using STATGRAPHICS plus 5.0 software from ANOVA and the LSD statistical tests. Differences between mean values were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Adenosine A₁ receptors in AD

Adenosine A₁ receptors were studied by radioligand binding assay using [³H]DPCPX, a selective A₁ receptor antagonist, as radioligand. [³H]DPCPX binding to human brain was saturable and well-adjusted to a single binding site model in all cases. As shown in Figure 1, the total adenosine A₁ receptor number was significantly increased in AD (318.4% of controls, $P < 0.001$). The increase was observed in the early stages of the disease (stages I-IV of Braak and Braak) without differences with respect to advanced stages (stages V and VI). However, no significant differences were observed in their corresponding receptor affinity (K_d) value, thus showing that receptor affinity was similar in control and AD cases. Figure 2 illustrates total receptor number values in different AD stages. An increased adenosine A₁ receptor number is already observed at stage I, suggesting early involvement of this receptor. These results were confirmed by Western blot using specific A₁ receptor antibodies in which a significant increase in the corresponding band of 37 kDa was observed in both early and advanced stages of AD when compared with controls (Figure 3).

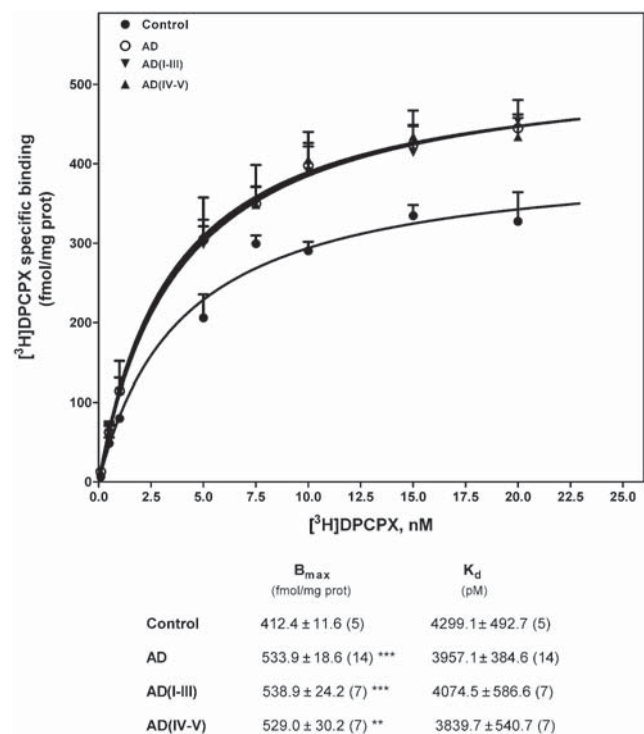


Figure 1. Adenosine A₁ receptor detection in frontal cortex brain from Alzheimer's disease (AD). Saturation curves of [³H]DPCPX binding to plasma membranes were performed by incubation of 50–75 μ g of membranes from control and AD brains with increasing concentrations of the radioligand, as described in *Materials and methods*. Total receptor number (B_{max}) and receptor affinity (K_d) determined by Scatchard and non-linear regression analysis are shown in the inset. Data are mean \pm SEM of control and AD cases performed in triplicate using different plasma membrane isolations. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from control value.

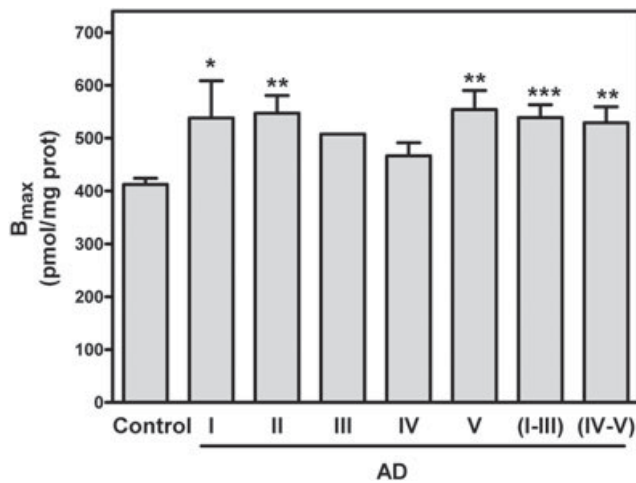


Figure 2. Total receptor number (B_{max}) values of control and different stages of Alzheimer's disease (AD). Data were extracted from saturation assays performed at different stage of AD classified in accord with Braak and Braak, 1999. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from control value.

Adenosine A_{2A} receptors in AD

Adenosine A_{2A} receptors were determined by binding assay using [³H]ZM 241385, a selective A_{2A} receptor antagonist, as radioli-

gand. [³H]ZM 241385 specific binding was increased in AD. A significant increase in total A_{2A} receptors was observed in early and advanced stages of AD. However, a significant increase in K_d values was observed in association with the increase in A_{2A} receptors, suggesting a lower receptor affinity (Figure 4). The increase in A_{2A} protein level, although not significant, was also detected by Western blot assays (Figure 5).

Adenylyl cyclase I in AD

Western blot to ACI did not reveal significant differences in the expression levels of ACI between control and AD cases at any stage of the disease (Figure 6).

mRNA levels of A₁, A_{2A} and ACI determined by real time PCR

We also analyzed adenosine A₁R and A_{2A}R mRNA levels by TaqMan PCR using human post-mortem frontal cortex from patients suffering ADI, ADIII and ADV compared with age-matched controls. For each experimental sample, the amount of target and endogenous references was determined from the appropriate standard curve which was plotted showing the cycle threshold, Ct (y), vs. the log of ng total control RNA (Figure 7A). Then the amount of each target was divided by the endogenous references β-glucuronidase (GUSB) and β-actin amount to obtain a normalized target value which permits determination of the relative

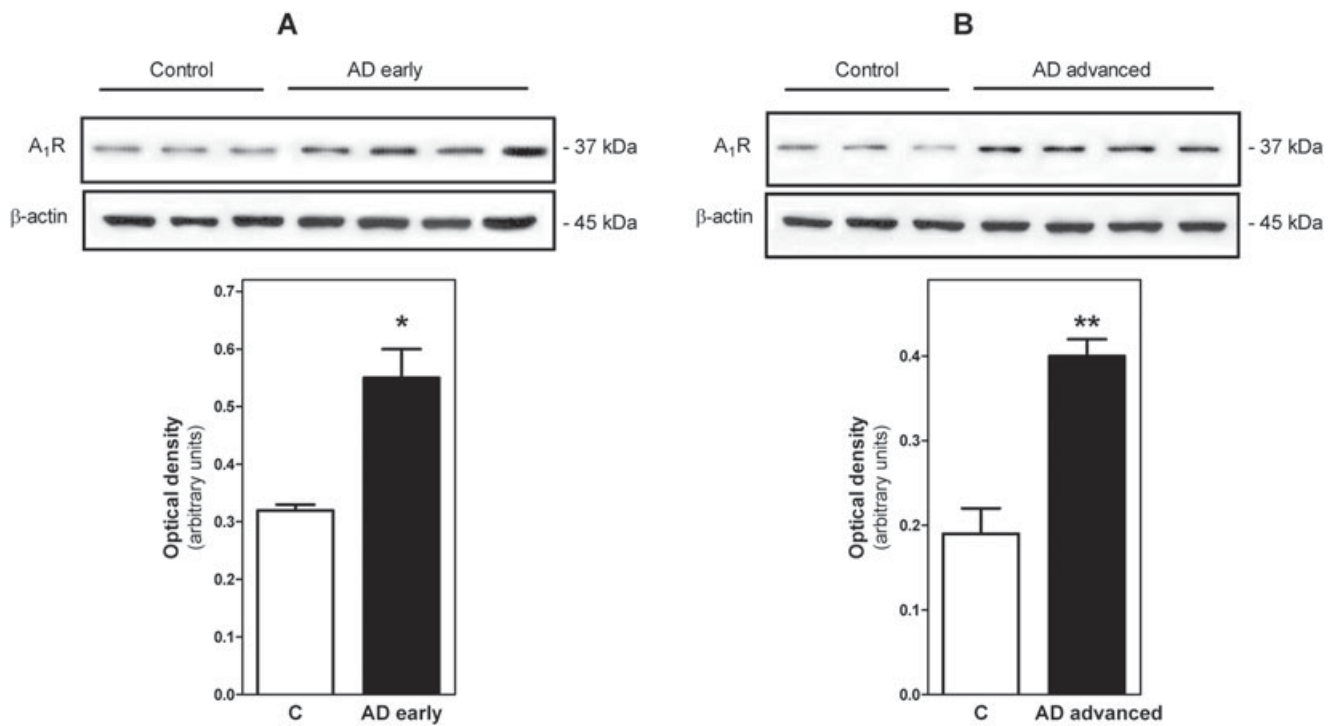


Figure 3. Detection of A₁R by Western blot. Thirty micrograms of protein was subjected to SDS/PAGE, transferred electrophoretically to nitrocellulose and probed with antisera anti-A₁, as described in *Materials and methods*. For the control of protein, loading membranes were incubated with anti-β-actin. Panel **A** represent assays from early stages and

Panel **B** from advanced stages of Alzheimer's disease (AD). Data are means ± SEM of represented cases. Inset shows A₁ and β-actin bands corresponding to a representative experiment. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ significantly different from control value.

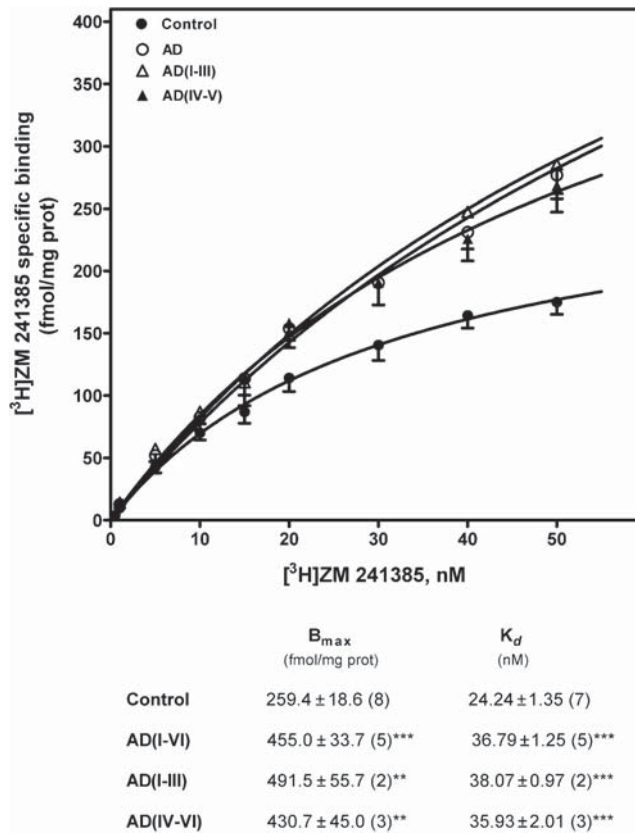


Figure 4. Adenosine A_{2A} receptor detection in frontal cortex brain from Alzheimer's disease (AD). Saturation curves of [3 H]ZM 241385 binding to plasma membranes were performed by incubation of 50–75 μ g of membranes from control and AD brains as described in *Materials and methods*. Total receptor number (B_{max}) and receptor affinity (K_d) determined by Scatchard and non-linear regression analysis are shown in the inset. Data are mean \pm SEM of control and AD cases performed in triplicate using different plasma membranes isolations. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significantly different from control value.

mRNA levels of A_1R and $A_{2A}R$ in control and diseased samples. The use of both endogenous control genes has been previously established by our group (6). Relative A_1R (Figure 7B) and $A_{2A}R$ (Figure 7C) mRNA levels were not modified in the frontal cortex in early and advanced stages of AD when compared with control samples. The same results were obtained when normalization was performed with β -actin (data not shown). mRNA coding ACI was not different between control (1.00 ± 0.20 , $n = 5$) and diseased cases (1.14 ± 0.48 , $n = 4$).

Adenylyl cyclase activity in AD

Basal, GTP γ S- and Forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity were not altered, suggesting no differences in the G-protein coupling to adenylyl cyclase (AC) in frontal cortex in AD (Figure 8). The inhibitory effect of CHA, a selective A_1 agonist, on Forskolin-stimulated activity was increased in frontal cortex AD (Table 2). The stimulatory effect of CGS 21680, a selective A_{2A} agonist, was

also enhanced in frontal cortex in AD (Table 2), suggesting a sensitization of adenosine receptors/adenylyl cyclase systems.

DISCUSSION

Brain adenosine receptors have been suggested as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. A_1 receptor has long been known to mediate neuroprotection, mostly by blockade of calcium influx, which results in inhibition of glutamate release and reduction of its excitatory effects at a postsynaptic level (1, 15, 17, 26, 30). However, the role of A_{2A} receptor in neuroprotection is not so clear, probably because of its lack of abundance in brain regions other than the striatum. Beneficial effects evoked by A_{2A} receptor antagonists may be caused by blockade of presynaptic A_{2A} receptors which are stimulatory on glutamate release (1). Blocking A_{2A} receptor function using antagonists or deleting the A_{2A} receptor gene results in a decrease in the extent of neuronal damage in adult animals. However, the mechanisms of this neuroprotection remain unknown (9).

Adenosine A_1 and A_{2A} receptors have been detected in post-mortem human brain (24, 31). A_1 receptors are vulnerable to AD. However, the results are controversial. Previous autoradiography and binding experiments have shown that A_1 receptors were significantly reduced, with receptor affinity being higher in the hippocampus of AD patients as compared with controls (14, 32). In contrast, an increase in Adenosine A_1 receptor immunoreactivity was found in neurons with neurofibrillary tangles, dystrophic neurites of senile plaques in the hippocampus and the frontal cortex of AD patients (4).

Recently, we described how metabotropic glutamate receptors are significantly decreased in AD and noted that the loss of mGlu receptors was more pronounced with disease progression (2). The results presented herein provide evidence that adenosine A_1 and A_{2A} receptors are up-regulated in the frontal cortex in the same series of cases with AD, thus indicating different responses between metabotropic glutamate receptors and adenosine receptors in the frontal cortex in AD. This up-regulation is accompanied by the sensitization of inhibitory and stimulatory transduction pathways mediated by adenosine receptors.

Discrepancies between previous studies and the present findings regarding expression of A_1 receptors in AD cases can be explained

Table 2. Adenosine receptors mediated Adenylyl cyclase activity in Alzheimer's disease (AD).

	Adenylyl cyclase activity	
	A_1 -mediated (% of inhibition of Fsk-stimulated)	A_2 -mediated (% of basal)
Control	23.3 \pm 6.0 (8)	179.1 \pm 18.9 (8)
AD	40.1 \pm 3.3 (11)*	253.7 \pm 35.7 (9)*

Inhibitory effect of N^6 -cyclohexyladenosine, selective A_1 receptor agonist, on Forskolin-stimulated adenylyl cyclase (AC), and stimulatory effect of CGS21680, selective A_{2A} receptor agonist, on basal AC were analyzed in samples from frontal cortex of AD as compared with control. Data are means \pm SEM of experiments performed in triplicate with membrane preparations from different cases. * $P < 0.05$ significantly different from control value.

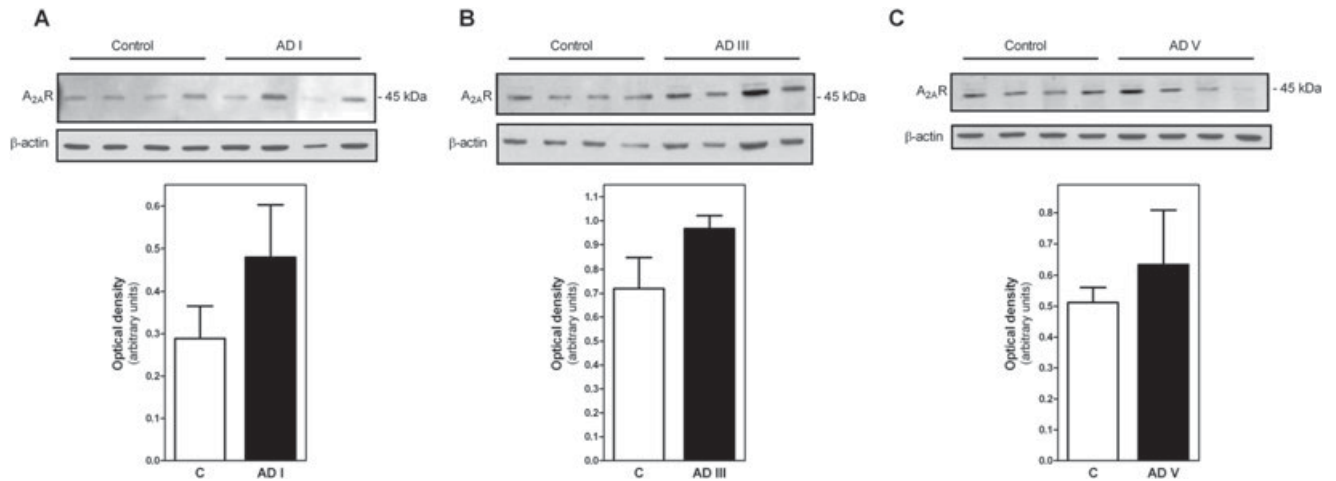


Figure 5. Detection of $A_{2A}R$ by Western blot. Thirty micrograms of protein was subjected to SDS/PAGE, transferred electrophoretically to nitrocellulose and probed with antisera anti- A_{2A} , as described in *Materials and methods*. For the control of protein, loading membranes were

incubated with anti- β -actin. A_{2A} was analyzed separately from Alzheimer's disease (AD) stage I (**A**), stage III (**B**) or stage V (**C**). Data are means \pm SEM of represented cases. Inset shows A_{2A} and β -actin bands corresponding to a representative experiment.

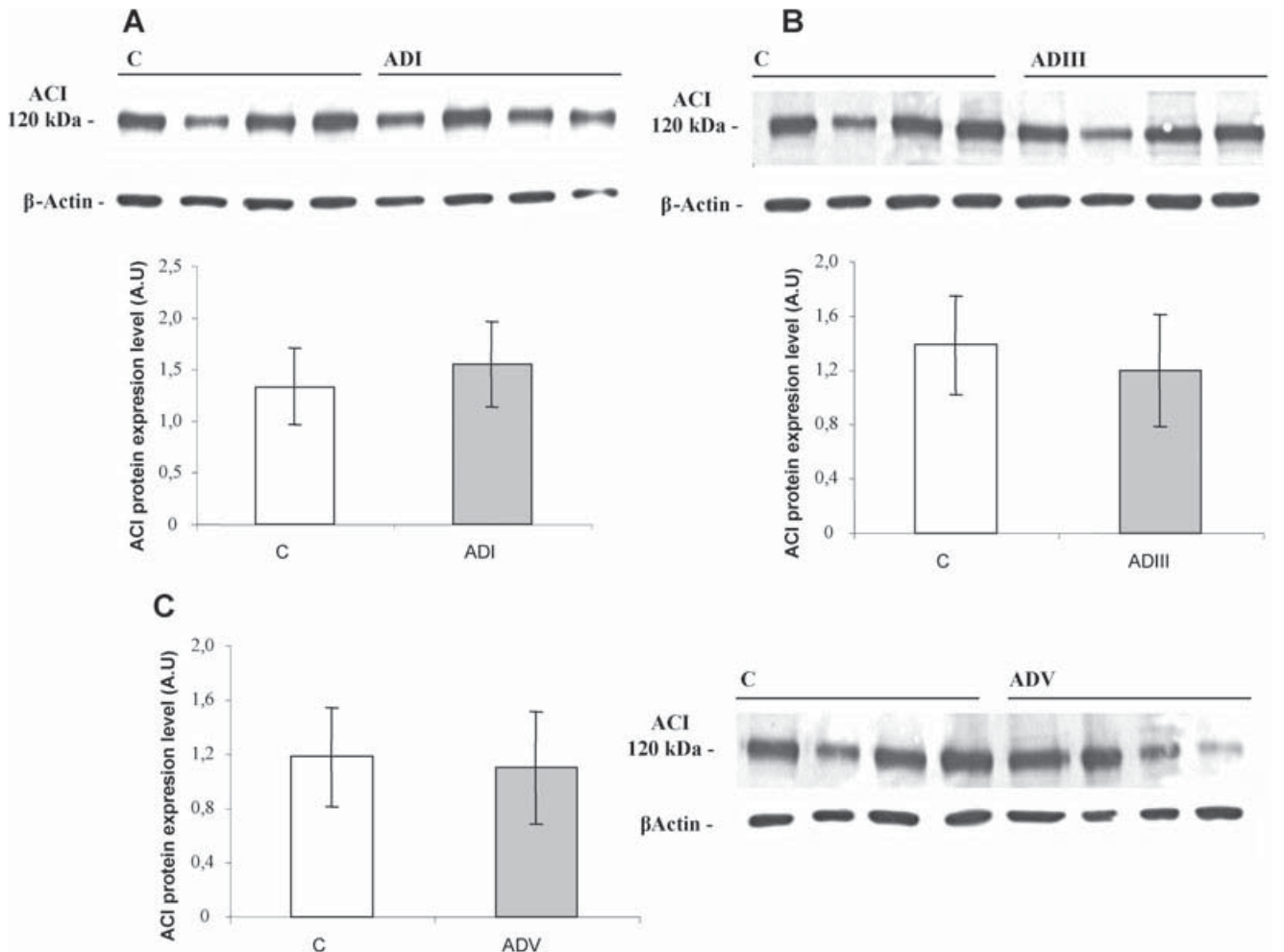


Figure 6. Detection of adenylyl cyclase I (ACI) by Western blot. Assays were performed as described in *Methods* and in the legend of Figure 3. ACI was analyzed separately from Alzheimer's disease (AD) stage I (**A**), stage III (**B**) or stage V (**C**). Data are means \pm SD of represented cases. Inset shows ACI and β -actin bands corresponding to a representative experiment.

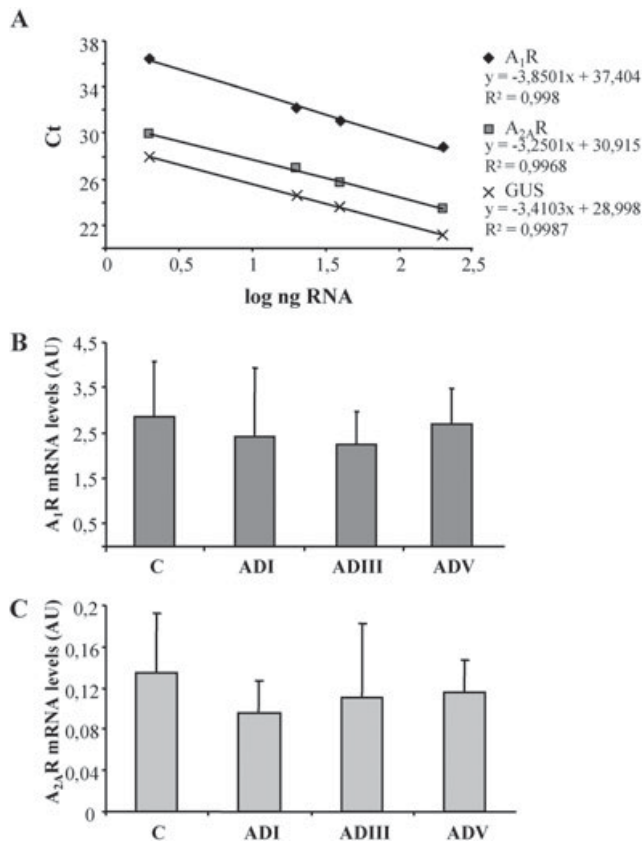


Figure 7. mRNA levels detected by real time PCR. **A.** Representative standard curves for A_1R , $A_{2A}R$ and GUSB constructed from several concentrations of control human brain RNA. C_t values (y-axis) vs. log of several RNA concentrations of control samples (x-axis) show a reverse linear correlation. **B.** Relative A_1R and C, $A_{2A}R$ expression levels (mean \pm SD) normalized with GUSB in the frontal cortex of controls (C, $n = 6$) and different stages of Braak and Braak in Alzheimer's disease (AD) samples (ADI, $n = 3$; ADIII, $n = 4$; ADV, $n = 6$).

on the basis of the different methods used. Yet the convergence of results, using various approaches such as binding assays, RT-PCR and gel electrophoresis and Western blotting to analyze binding, mRNA levels and protein levels, respectively, provides a robust combination of techniques in support of the present observations.

In agreement with our results, significantly higher levels of cortical A_1 and hippocampal A_{2A} receptors have been found in a transgenic mice model of AD bearing the APP Swedish mutation when compared with non-transgenic mice (5).

Apart from striatum, adenosine A_{2A} receptors have been detected in other human brain areas such as cortex (3, 19, 31). These receptors are involved in neurodegenerative diseases involving the cerebral cortex, as a significant increase in A_{2A} receptors has been detected in frontal cortex in Pick's disease (3). Moreover, cAMP signaling, as mediated by A_{2A} receptors, increases cellular levels of amyloid precursor protein by stimulating APP gene expression in astrocytes (21). Finally, caffeine, an A_{2A} receptor antagonist, prevents $A\beta$ toxicity in mice (12) and rat cultured cerebellar granule neurons (11).

The possible role of adenosine receptors in processes involved in the pathophysiology of AD is unknown. Location of A_1R in neurodegenerative structures of AD has been described. A marked increase in Adenosine A_1 receptor immunoreactivity was found in degenerating neurons with neurofibrillary tangles and in dystrophic neurites of senile plaques in frontal cortex and hippocampus of AD. A high degree of co-localization of A_1R and $A\beta$ in senile plaques and of A_1R and tau in neurons with tau deposition, but without tangles, has been shown. A_1R are involved in APP processing and in tau phosphorylation and in its translocation toward cytoskeleton in a human neuroblastoma cell line (4). Furthermore, increased A_1R levels have also been detected in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in the murine bovine spongiform encephalopathy model at advanced stages of the disease and coincidental with the appearance of PrP expression in brain from CJD (27). Therefore, changes in adenosine receptors seem not to be limited to AD neurodegeneration.

In summary, the present results show that adenosine A_1 and A_{2A} receptors are up-regulated and sensitized in the AD frontal cortex, suggesting involvement of these receptors in the pathogenesis of AD, and opening new perspectives to therapeutic strategies geared to promote A_1R and antagonize $A_{2A}R$ in AD.

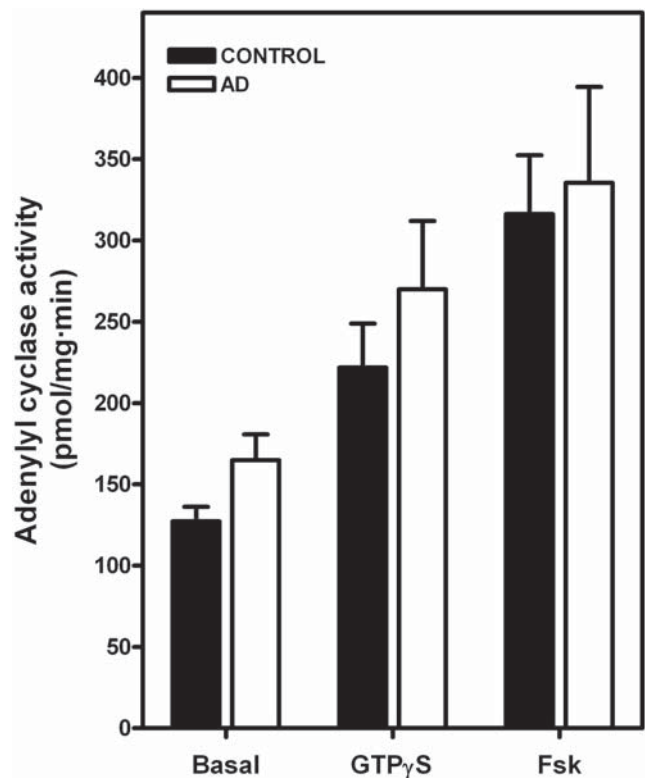


Figure 8. Adenylyl cyclase activity in brain plasma membranes from control and Alzheimer's disease (AD) cases. Fifteen to twenty micrograms of plasma membranes, previously treated with adenosine deaminase, were used to determine basal cAMP level and forskolin- or GTP γ S-stimulated in frontal cortex from AD ($n = 12$) and control ($n = 8$) cases. Data are means \pm SEM of n cases performed in triplicate using different membrane preparations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the European Union through the Marie-Curie Research Training Network PRAIRIES, contract MRTN-CT-2006-035810, FIS grants P102/0004, PI05/1631, G03/167 and C03/06 from the Instituto de Salud Carlos III, grants PAI-05-043 and GC05003 from Consejería de Educación y Ciencia and Consejería de Sanidad (Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha), by Brain Net II contract, and grants 04/301-01 and 04/301-02 from the Fundació "La Caixa". We wish to thank T. Yohannan for editorial assistance. We are very grateful to Jesús Moreno and Salvador Juvés for excellent technical support in RNA extraction, BioAnalyzer analysis and TaqMan PCR assays.

REFERENCES

1. Abbraccio MP, Cattabeni F (1999) Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Ann NY Acad Sci* **890**:79–92.
2. Albasanz JL, Dalfo E, Ferrer I, Martin M (2005) Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies correlates with stage of Alzheimer's-disease-related changes. *Neurobiol Dis* **20**:685–693.
3. Albasanz JL, Rodriguez A, Ferrer I, Martin M (2006) Adenosine A2A receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol* **16**:249–255.
4. Angulo E, Casado V, Mallol J, Canela EI, Vinals F, Ferrer I *et al* (2003) A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* **13**:440–451.
5. Arendash GW, Schleif W, Rezai-Zadeh K, Jackson EK, Zacharia LC, Cracchiolo JR *et al* (2006) Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience* **142**:941–952.
6. Barrachina M, Castano E, Ferrer I (2006) TaqMan PCR assay in the control of RNA normalization in human post-mortem brain tissue. *Neurochem Int* **49**:276–284.
7. Braak H, Braak E (1999) Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology. In: *Cerebral Cortex. Vol. 14: Neurodegenerative and Age-related Changes in Structure and Function of Cerebral Cortex*. A Peters, JH Morrison (eds), pp. 475–512. Kluwer Academic/Plenum Press: New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
8. Cowburn RF, O'Neill C, Ravid R, Alafuzoff I, Winblad B, Fowler CJ (1992) Adenyl cyclase activity in postmortem human brain: evidence of altered G protein mediation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **58**:1409–1419.
9. Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal* **1**:111–134.
10. Dalfo E, Albasanz JL, Martin M, Ferrer I (2004) Abnormal metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the cerebral cortex in diffuse Lewy body disease is associated with irregular alpha-synuclein/phospholipase C (PLCbeta1) interactions. *Brain Pathol* **14**:388–398.
11. Dall'Igna OP, Porciuncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2003) Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol* **138**:1207–1209.
12. Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR (2007) Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25–35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* **203**:241–245.
13. Deckert J, Gleiter CH (1994) Adenosine—an endogenous neuroprotective metabolite and neuromodulator. *J Neural Transm Suppl* **43**:23–31.
14. Deckert J, Abel F, Kunig G, Hartmann J, Senitz D, Maier H *et al* (1998) Loss of human hippocampal adenosine A1 receptors in dementia: evidence for lack of specificity. *Neurosci Lett* **244**:1–4.
15. Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* **24**:31–55.
16. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **53**:527–552.
17. Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM (2005) Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* **63**:191–270.
18. Ikeda M, Mackay KB, Dewar D, McCulloch J (1993) Differential alterations in adenosine A1 and kappa 1 opioid receptors in the striatum in Alzheimer's disease. *Brain Res* **616**:211–217.
19. Ishiwata K, Mishina M, Kimura Y, Oda K, Sasaki T, Ishii K (2005) First visualization of adenosine A(2A) receptors in the human brain by positron emission tomography with [¹¹C]TMSX. *Synapse* **55**:133–136.
20. Kalaria RN, Sromek S, Wilcox BJ, Unnerstall JR (1990) Hippocampal adenosine A1 receptors are decreased in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **118**:257–260.
21. Lee RK, Araki W, Wurtman RJ (1997) Stimulation of amyloid precursor protein synthesis by adrenergic receptors coupled to cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:5422–5426.
22. Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, Fernandez M, Martin M (2002) Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *J Neurochem* **82**:625–634.
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275.
24. Nakata H (1992) Biochemical and immunological characterization of A1 adenosine receptors purified from human brain membranes. *Eur J Biochem* **206**:171–177.
25. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**:413–492.
26. Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A (2003) Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect* **16**:80–86.
27. Rodriguez A, Martin M, Albasanz JL, Barrachina M, Espinosa JC, Torres JM, Ferrer I (2006) Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP mice. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**:964–975.
28. Rudolph KA, Schubert P (1997) Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia. *Behav Brain Res* **83**:123–128.
29. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**:789–791.
30. Stone TW (2005) Adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Neurol Res* **27**:161–168.
31. Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB (1997) Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse* **27**:322–335.
32. Ulas J, Brunner LC, Nguyen L, Cotman CW (1993) Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* **52**:843–854.

3. La metilació de l'ADN regula l'expressió del receptor d'adenosina A_{2A} en la superfície cel·lular

Sandra P. Buira, José Luis Albasanz, Guido Dentese, Jesús Moreno, Mirena Martín, Isidre Ferrer and Marta Barrachina

El receptor d'adenosina A_{2A} (A_{2A}R) és un receptor purinèrgic acoblat a proteïna G que respon a l'adenosina com a lligand endogen. Estudis clínics amb antagonistes específics del l' A_{2A}R han demostrat la seva eficàcia en el tractament de malalts de Parkinson que desenvolupen discinèsies com a conseqüència del tractament amb levodopa. Malgrat els nombrosos estudis farmacològics per modular la seva activitat, la seva regulació gènica ha estat poc estudiada. *ADORA2A* és el gen que codifica pel A_{2A}R i consta de tres exons: dos codificants (exó 2 i 3) i un no codificant (exó 1). Aquest presenta 6 isoformes (h1A-h1F) dependents de teixit on la h1E és la majoritària a cervell. Amb la intenció de conèixer si canvis en el grau de metilació poden controlar l'expressió del receptor, vam estudiar 15 Kbases de la regió 5'UTR de gen *ADORA2A*. L'anàlisi es va dur a terme sobre tres línies cel·lulars amb diferents nivells d'expressió d'ARNm de l'A_{2A}R emprant la plataforma MassArray de SEQUENOM. Un cop tractades amb un agent desmetilant com l'azacitidina, es va observar una forta pèrdua de metilació en les HeLa, lleugera en les SH-SY5Y i nul·la en les U87-MG, de forma inversament proporcional a l'augment de l'ARNm de receptor. Ademés, la pèrdua de metilació es va confirmar amb un assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) contra MeCP₂. Aquests resultats es van confirmar a nivell de proteïna per western blot i amb l'assaig d'unió al radiolligand. Simultàniament es van tractar les cèl·lules amb un agent metilant, la S-adenosilmetionina, detectant una disminució dels nivells d'ARNm i de proteïna del receptor en les SH-SY5Y i U87-MG. En aquestes condicions, es va observar un augment de la unió de MeCP₂ per la regió 5'UTR del gen *ADORA2A* per ChIP. La conclusió del treball és que la metilació de l'ADN regula l'expressió basal del gen *ADORA2A*.

DNA methylation regulates adenosine A_{2A} receptor cell surface expression levels

Sandra P. Buira,* José Luis Albasanz,† Guido Dentesano,* Jesús Moreno,* Mairena Martín,† Isidre Ferrer*‡§ and Marta Barrachina*§

*Institut de Neuropatologia, Servei d'Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

†Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Químicas, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

‡Unitat de Neuropatologia Experimental, Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

§Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Spain

Abstract

Adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs) appear to play important roles in inflammation and in certain diseases of the nervous system. Pharmacological modulation of A_{2A}Rs is particularly useful in Parkinson's disease and has been tested in schizophrenia. However, little is known about the regulation of A_{2A}R gene (*ADORA2A*). A bioinformatic analysis revealed the presence of three CpG islands in the 5' UTR region of human *ADORA2A*. Next, HeLa, SH-SY5Y and U87-MG cells were treated for 48 h with 5 μM 5-azacytidine (Aza). Increased A_{2A}R levels were demonstrated in HeLa and SH-SY5Y cells when compared with non-treated cells. No modifications were seen in U87-MG cells. The increased A_{2A}R mRNA and protein levels were accompanied by a loss of DNA methylation pat-

tern in HeLa and SH-SY5Y cells, as measured with the SEQUENOM MassArray platform. The Aza treatment also reduced the affinity of a methyl-CpG-binding protein for *ADORA2A* by quantitative chromatin immunoprecipitation in HeLa cells. Interestingly, A_{2A}R levels were reduced by *S*-adenosyl-L-methionine treatment in U87-MG and methyl-CpG-binding protein affinity was increased for *ADORA2A* by quantitative chromatin immunoprecipitation. Therefore, these results show for the first time that DNA methylation plays a role in *ADORA2A* transcription and, subsequently, in constitutive A_{2A}R cell surface levels.

Keywords: 5-azacytidine, adenosine A_{2A} receptor, CpG island, DNA methylation, *S*-adenosyl-L-methionine. *J. Neurochem.* (2010) 10.1111/j.1471-4159.2009.06538.x

Adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs) are G-protein coupled receptors that stimulate adenylyl cyclase activity through G_s proteins, promoting accumulation of intracellular cAMP (Fredholm *et al.* 2001). The activation of these receptors mediates multiple physiological effects of adenosine in the CNS and peripheral tissues (Fredholm *et al.* 2005a). A_{2A}Rs are highly expressed in the spleen, thymus, leukocytes and blood platelets; A_{2A}Rs expressed in immune cells play a protective role, attenuating inflammation and tissue damage (Ohta and Sitkovsky 2001). In the CNS, the most enriched A_{2A}Rs brain region is the striatum, in which A_{2A}Rs are largely restricted to the subset of striatopallidal GABAergic neurons co-expressing dopamine D₂ receptors (D₂Rs), where they play out antagonistic interactions with D₂Rs (Ferre *et al.* 1991). As a result of this interaction, antag-

onists of A_{2A}Rs have been proposed as non-dopaminergic anti-parkinsonian agents facilitating the availability of D₂Rs (Schwarzschild *et al.* 2006). Clinical trials have proven that antagonists reduce the postsynaptic effects of dopamine

Received September 22, 2009; revised manuscript received November 17, 2009; accepted December 5, 2009.

Address correspondence and reprint requests to Marta Barrachina, Institut de Neuropatologia, Servei d'Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, c/Feixa Llarga sn, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. E-mail: mbarrachina@idibell.cat

Abbreviations used: ADA, adenosine deaminase; CGI, CpG island; CpG, dinucleotide CG; CREB, cAMP-response element binding protein; D₂R, dopamine D₂ receptor; GUSB, β-glucuronidase; MeCP₂, methyl-CpG-binding protein; NFκβ, nuclear factor kappa-beta; qChIP, quantitative chromatin immunoprecipitation; SAM, *S*-adenosyl-L-methionine.

depletion and lessen motor symptoms of Parkinson's disease (Bara-Jimenez *et al.* 2003; LeWitt *et al.*, 2008; Simola *et al.* 2008). Therapeutic uses of A_{2A}Rs modulation are not restricted to Parkinson's disease, as blockage of these receptors has been shown to be beneficial in animal models of epilepsy, ischemia and Huntington disease (Jones *et al.* 1998; Chen *et al.* 1999; Popoli *et al.* 2002). Furthermore, A_{2A}Rs agonists have been proposed as therapeutic agents for schizophrenia (Ferré 1997) and other psychotic disorders (Cunha *et al.* 2008). The application of drugs that modulate A_{2A}R is presently a field of interest in an increasing number of experimental models including inflammation, cancer and diseases of the nervous system (Lukashev *et al.* 2004; Fredholm *et al.* 2005b; Ohta *et al.* 2006).

The human A_{2A}R gene (*ADORA2A*) is localized to chromosome 22 (MacCollin *et al.* 1994; Le *et al.* 1996; Peterfreund *et al.* 1996). It consists of two coding exons (exon 2 and 3) separated by a single intron of nearly 7 kb. The exon 1 is a non-coding exon which is located at 5' upstream exon 2 and presents six tissue-specific isoforms: h1A–h1F (Yu *et al.* 2004). Human exon 1E and its murine counterpart, exon m1C, share 74% sequence homology, indicating that this genomic region is highly preserved and probably plays an important role in the expression of A_{2A}R. Interestingly, differential expression of these isoforms has been reported in granulocytes of patients suffering from sepsis, indicating that 5' UTR plays an important regulatory role in A_{2A}R expression (Kreth *et al.* 2008).

The present study was designed to learn about the role of DNA methylation in the expression of A_{2A}R, and to learn whether modulation of *ADORA2A* by DNA methylating and demethylating agents can eventually be translated into functional A_{2A}R cell surface expression.

Material and methods

Materials

[³H]ZM241385 ([2-³H](4-(2-[7-amino-2-(2-furyl) [1,2,4] triazolo [2,3- α] [1,3,5] triazin-5-ylamino]ethyl)phenol 27.4 Ci/mmol) was from Tocris (Bristol, UK). Theophylline, 5-azacytidine, S-adenosyl-L-methionine (SAM) and calf intestine adenosine deaminase (ADA) were obtained from Sigma (Madrid, Spain). All other products were of analytical grade.

Cell culture

The human epithelial HeLa and neuroblastoma SH-SY5Y cells were maintained in Dulbecco's minimal essential medium (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum; human glioblastoma U87-MG cells were maintained in minimal essential medium (MEM Eagle) with 2 mM L-glutamine and supplemented with 10% fetal bovine serum and 1 mM sodium pyruvate. All cell lines were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

5-Azacytidine and SAM treatment

The cell lines analyzed were plated in 6-well dishes at a concentration of 10⁵ (HeLa) and 2 × 10⁵ (U87-MG) cells/well and cultured overnight before 5-azacytidine treatment. This reagent was prepared at 5 mM with acetic acid : water (1 : 1) which was considered as the vehicle in the results section. Cells were treated with a dose of 5 μ M for 48 h. For binding assays cells were plated on 24-well plates. For SAM treatment, 15 × 10⁴ SH-SY5Y cells were also plated and cultured for the following 6 days without changing the medium. This procedure did not promote cellular death or changes in the color of the culture medium.

Quantitative DNA methylation analysis

DNA purification, bisulfite treatment and quantitative DNA methylation analysis by MassArray platform of SEQUENOM were performed as recently described (Barrachina and Ferrer 2009). Six loci of 5' UTR of *ADORA2A* gene were analyzed to learn their percentage of DNA methylation. Primers for each region were designed using MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Every reverse primer presented a T7-promoter tagged to obtain an appropriate product for *in vitro* transcription and an 8 bp insert to prevent abortive cycling. The forward primers contained a 10mer-tagged to balance the PCR primer length. The sequences of primers used for amplification of bisulfite-treated DNA were (tags incorporated are indicated below in lower case and underlined):

A_{2A}R-10069 (PCR 1): forward, 5'-aggaagagagTTAGTTGATTAATATGGTGAAATAT-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctCCCCTACAAACAACCTTTAAAC-3';

A_{2A}R-9218 (PCR 2): forward, 5'-aggaagagagTTTGTGAAGGGTTAGGTATAGTTA-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctATCCATCCCTACTAAAAAACTC-3';

A_{2A}R-8973 (PCR 3): forward, 5'-aggaagagagGAGTTTTTTTAGTAGGGATGGAT-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctAACCTAAAACCCAACCTAAATCT-3';

A_{2A}R-7883 (PCR 4): forward, 5'-aggaagagagTTTTAGTGTTGAGTTGGTTGAGTT-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctACAATCCCTATAATATCCCTAACCC-3';

A_{2A}R-6643 (PCR 5): forward, 5'-aggaagagagAGTATAGGGGATGATGGGAGTTTA-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctACCAAAACAAAACCTAACCTACTT-3';

A_{2A}R-5301 (PCR 6): forward, 5'-aggaagagagTGGTTGTTTATTATTGGGTAGTGAG-3', reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggaagagctCAAAAACCTTTAAAATCTCCAAAAA-3'.

More detailed information about these primers and PCR reactions is found in Table 2.

RNA purification

The purification of RNA from cell lines was carried out with RNeasy Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol provided by the manufacturer. The concentration of each sample was obtained from A₂₆₀ measurements with Nanodrop 1000. RNA integrity was tested using the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Retrotranscription reaction

The retrotranscriptase reaction (50 ng RNA/ μ L) was carried out by using the High capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain) following the protocol provided by the supplier.

Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of MultiScribe Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA.

SYBR green PCR

The analysis of $A_{2A}R$ mRNA isoforms was performed in 25 μ L SYBR Green reaction: 5 μ L cDNA were mixed with 0.5 μ L of forward and reverse primers (10 μ M) and 12.5 μ L of master mix. Every experimental condition was carried out in triplicate in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The reactions were performed using the following parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All real time PCR data were captured using the Sequence Detector Software (SDS version 1.9, Applied Biosystems), and PCR products were evaluated by SYBR green melting curve analyses as well as being checked by agarose gels. The comparative Ct method was used to determine $A_{2A}R$ mRNA isoform levels. Briefly, expression levels of each isoform were normalized with β -glucuronidase (GUSB) and relative to the calibrator. This consisted of the mean expression level of the corresponding isoform in non-treated cells as follows: $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-[(C_t \text{ specific isoform} - C_t \text{ GUSB}) \text{ treated-cells} - (C_t \text{ specific isoform} - C_t \text{ GUSB}) \text{ non-treated cells}]}$. $A_{2A}R$ mRNA isoforms were amplified with the following set of primers. Isoform A: forward, 5'-CTGATCCTTGCCCTGAGT-3'; Isoform B: forward, 5'-GGGTCTCTGGCTTGCCCTT-3'; Isoform C: forward, 5'-AGCTGCCTCACCGTATCAAT-3'; Isoform D: forward, 5'-GACTGTGACATGGAGCAGGA-3'; Isoform E: forward, 5'-CGTGCGAGCGGCAGGT-3'; Primer reverse: 5'-CAAGGGCTTTTTCACAGAGG-3'. All these set of primers were previously tested by Kreth *et al.* (2008).

TaqMan PCR

TaqMan PCR assays for every gene were performed in duplicate on cDNA samples in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). For each 20 μ L TaqMan reaction, 9 μ L cDNA was mixed with 1 μ L 20 \times TaqMan Gene Expression Assays and 10 μ L of 2 \times TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Parallel assays for each sample were carried out using primers and probe for GUSB for normalization. The reactions were carried out using the following parameters: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Standard curves were prepared for $A_{2A}R$ and GUSB using serial dilutions of U87-MG cells. Finally, all TaqMan PCR data were captured using the Sequence Detector Software (SDS version 1.9, Applied Biosystems).

The TaqMan assay for GUSB (Hs99999908_m1, TaqMan probe 5'-GACTGAACAGTCACCGACGAGAGTG-3') is located between 11 and 12 exon boundary, at position 1816 of NM_000181.1 transcript sequence. The TaqMan assay for $A_{2A}R$ (Hs00169123_m1, TaqMan probe 5'-CCGCTCCGGTACAATGGCTTGGTGA-3') is located between 2 and 3 exon boundary, at position 790 of NM_000675.4 transcript, generating an amplicon of 66 base pairs. Therefore, this probe amplifies total $A_{2A}R$ mRNA levels.

Western blot

HeLa cells were lysed with ristocetin-induced platelet agglutination buffer. Lysates were maintained in agitation for 30 min at 4°C and then centrifuged at 15 000 g for 12 min at 4°C. Protein concentra-

tion was determined with BCA (Pierce, Woburn, MA, USA) method. 20 μ g of the resultant supernatant was used for western blot analysis as previously described (Perez-Buira *et al.* 2007). The following antibodies were used: rabbit polyclonal B-Myb (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, sc-725, c-20) used at a dilution of 1 : 100, rabbit polyclonal nuclear factor kappa-beta (NF κ B) subunit p65 (A) (Santa Cruz, sc-109) diluted 1 : 100, rabbit polyclonal $A_{2A}R$ (ab-3461, Abcam, Cambridge, UK) used at a dilution of 1 : 500, and mouse monoclonal anti- β -actin (clone AC-74, Sigma) diluted 1 : 5000.

Detection of A_{2A} receptors by radioligand binding assay

Radioligand binding assays using intact cells were performed in 24-well plates as described earlier (Ruiz *et al.* 2000) with some modifications. Briefly, cells were washed with their respective serum-free culture media and pre-incubated with 2 U/mL ADA in the same medium at 37°C for 30 min to remove endogenous adenosine. After this incubation, saturation assays were performed using different concentrations of [³H]ZM241385 (1–100 nM) in serum-free medium and in the presence of ADA. Theophylline in a concentration of 5 mM was used to check non-specific binding. A specific adenosine uptake inhibitor (10 μ M dipyridamole) was added to the reaction mixture in order to block adenosine transport. After incubation at 25°C for 2 h in a final volume of 250 μ L, cells were washed with ice-cold medium and disrupted with 0.2% sodium dodecyl sulfate. Well contents were then transferred to vials and scintillation liquid mixture was added to measure radioactivity. At least two wells from each plate were reserved for protein concentration measurement.

Protein determination

Protein concentration was measured by the method of Lowry (1951) for radioligand binding assay, using bovine serum albumin as standard.

Quantitative chromatin immunoprecipitation

Chromatin shearing from 10 000 HeLa and U87-MG cells, non-treated and azacytidine- or *S*-adenosylmethionine-treated, respectively for HeLa and U87-MG, was obtained using the BioruptorTM from Diagenode (Liege, Belgium). The resultant DNA (between 200 and 500 bp) was immunoprecipitated with 10 μ g of an anti-methyl-CpG-binding protein (MeCP₂) (ab2828, Abcam). As negative control, an immunoprecipitation was performed with 10 μ g of rabbit serum (sc-2338, Santa Cruz) using the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode). Immunoprecipitated (ChIP) and non-immunoprecipitated (Input) DNA were stored in 150 μ L of water. The analysis of ChIP was performed by *real time* PCR using SYBR Green technology (Applied Biosystems) as indicated above. Input DNA and ChIP (5 μ L) were amplified in triplicates in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The sequence and the PCR product length for each locus are indicated in Table 3 and Fig. S5. The value of the ChIP/Input ratio (percentage) was calculated following the instructions provided by the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode).

Statistical analysis

All results, excepting those related with radioligand binding, were analyzed by Statgraphics Plus v5 software, using ANOVA with *post-hoc*

Scheffe test. Binding data were analyzed using Student's *t*-test and nonlinear regression with the GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Differences between mean values were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Presence of CpG islands in the 5' UTR of *ADORA2A*

We analyzed the 15.5 kb 5' flanking region of the translation start site (ATG) of *ADORA2A* to find dinucleotide CpG-rich regions, using the MethPrimer software (see Material and Methods section). This region contains six isoforms of the non-coding exon 1 which were described by Yu *et al.* (2004) and which are schematically represented in Fig. 1(a). The bioinformatic analysis revealed three CpG islands (CGIs) surrounding exon 1E (Table 1).

5-Azacytidine treatment increases $A_{2A}R$ mRNA levels

To test whether DNA methylation regulates transcription of *ADORA2A*, we selected three different human cell lines, HeLa (epithelial cells), SH-SY5Y (neuroblastoma cells) and U87-MG (glioblastoma cells), based on sample cells with different baseline expression of $A_{2A}R$. Relatively low baseline mRNA levels were seen in HeLa cells, whereas higher mRNA levels were observed in SH-SY5Y and U87-MG cells under baseline conditions by TaqMan PCR (Fig. S1a). Note that TaqMan PCR was performed in parallel and under the same experimental conditions (see Material and Methods section) allowing the comparison of arbitrary units among the three cell lines. As $A_{2A}R$ TaqMan probe spans exons 2–3 all $A_{2A}R$ mRNA isoforms were amplified. The standard curves for $A_{2A}R$ and the endogenous control GUSB are shown in Fig. S1b. Next, we tested basal mRNA levels of $A_{2A}R$ isoforms A–E in all three cell lines by SyBr Green PCR and using specific set of primers as previously reported (Kreth *et al.* 2008; see Material and Methods section). Very low levels of $A_{2A}R$ mRNA isoforms A, C and D were found in HeLa cells; isoforms B and D in SH-SY5Y cells and isoforms B–D in U87-MG cells (data not shown). Then, we treated all three cell lines with 5 μ M 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation, for 48 h. $A_{2A}R$ mRNA isoforms B and E were highly increased in HeLa cells (Fig. 1b) and only $A_{2A}R$ mRNA isoform E was moderately increased in SH-SY5Y cells (Fig. 1c). In contrast, the vehicle alone had no effect on mRNA expression. A moderate non-specific increase in isoforms A and E was also detected in U87-MG cells as this increase also occurred with vehicle alone (Fig. 1d).

5-Azacytidine treatment increases $A_{2A}R$ protein levels as revealed by radioligand binding assays

In order to determine whether variation observed in $A_{2A}R$ mRNA levels was associated with modifications of protein

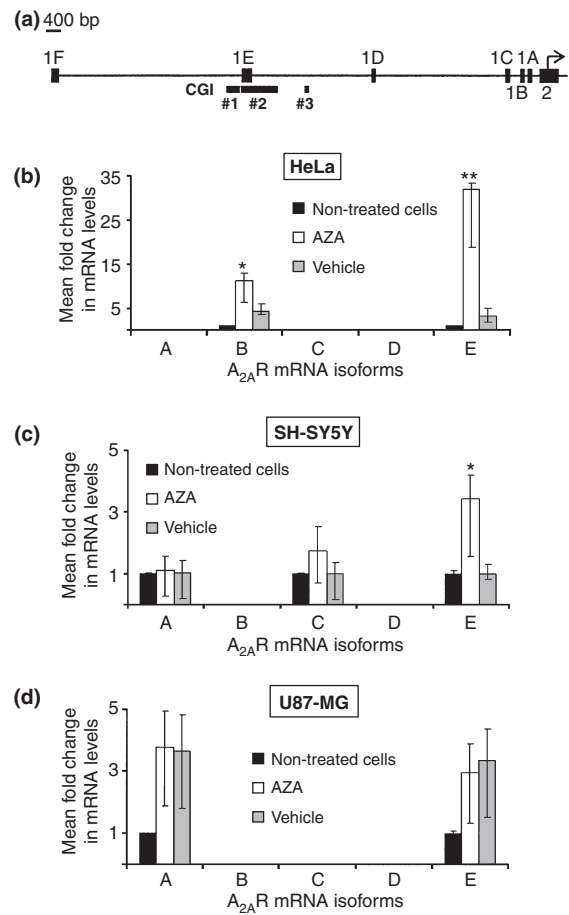


Fig. 1 Effect of 5-azacytidine treatment on endogenous $A_{2A}R$ mRNA levels. (a) Scaled representation of 5' UTR region of human *ADORA2A* gene established by Yu *et al.* (2004) who identified six isoforms of non-coding exon 1 (1A–1F). Three putative CpG islands surrounding exon 1E were predicted by MethPrimer software and are drawn in the diagram as CGI#1–3. The analysis corresponds to the DNA sequence located at 4209000–4214000 positions in human genomic contig NT_011520. CGIs positions are indicated in Table 1. The translational start site (ATG) is indicated with an arrow and its location is shown in Table 2. Mean fold change in $A_{2A}R$ mRNA isoforms after 5 μ M 5-azacytidine (Aza) treatment for 48 h in (b) HeLa, (c) SH-SY5Y and (d) U87-MG cell lines. The analysis was performed with SyBrGreen PCR and β -glucuronidase (GUSB) was used as endogenous control for normalization. Mean fold change calculation as well as specific set of primers are indicated in Material and Methods section. Treatments were performed in triplicate (6-well plates) in three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with non-treated cells (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test). Vehicle corresponds to acetic acid : water (1 : 1).

levels, we performed radioligand binding assays using [3 H]ZM 241385, a selective A_{2A} receptor antagonist, as radioligand. [3 H]ZM 241385 specific binding was saturable and well-adapted to a single binding site model in all cells assayed. Total receptor numbers (B_{max} value) were signifi-

Table 1 Genomic localization of the three CpG islands predicted in the 5' UTR region of human *ADORA2A* by a bioinformatic analysis

CpG island number	Localization in human genomic contig NT_011520	Localization in human <i>ADORA2A</i> ^a	Sequence length (bp)
#1	4209698–4210101	5' upstream exon 1E	404
#2	4210135–4211390	Includes the entire exon 1E	1255
#3	4212238–4212344	Intron between exon 1E and 1D	106

^aYu *et al.* (2004) – each exon 1 isoform is located in the following positions of human genomic contig NT_011520: exon 1A (4219157–4219262), exon 1B (4218964–4218995), exon 1C (4218447–4218563), exon 1D (4214171–4214282), exon 1E (4210164–4210494) and exon 1F (4204290–4204543).

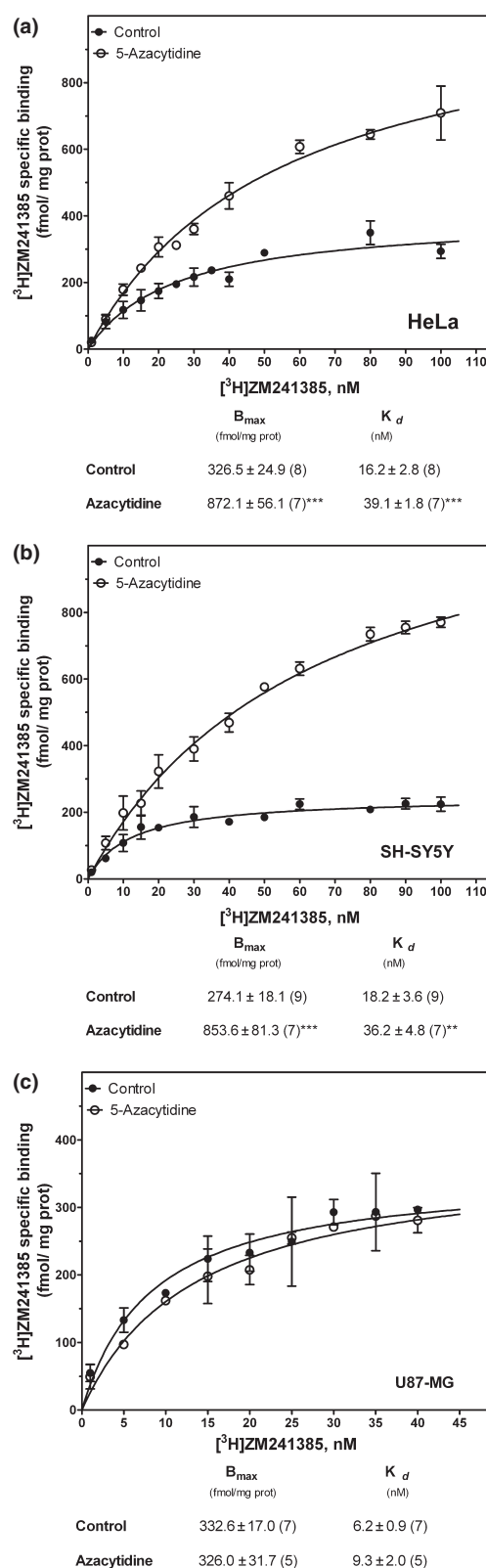
cantly increased in treated HeLa and SH-SY5Y cells (Fig. 2a and b), while $A_{2A}R$ levels in U87-MG cells were unaltered by 5-azacytidine (Fig. 2c). However, a significant increase in K_d value was observed in association with the increase in $A_{2A}R$ in HeLa and SH-SY5Y cells, suggesting a lower receptor affinity, probably as a compensatory mechanism to avoid an excessive A_{2A} receptor activation because of its higher levels at the cell surface.

5-Azacytidine treatment does not increase the expression of transcription factors related with *ADORA2A* expression

Few studies have been performed regarding *ADORA2A* transcriptional regulation. NF κ B has been described as a transcription factor that up-regulates $A_{2A}R$ levels (Murphree *et al.* 2005), and a B-Myb binding site has been found in the 5' UTR region of *ADORA2A* (St. Hilaire *et al.* 2009). In order to test whether the up-regulation of $A_{2A}R$ levels after 5-azacytidine was because of the induction of these related transcription factors, we checked the NF κ B p65 subunit and B-Myb levels in HeLa cells by western blot. A time course treatment with 5 μ M 5-azacytidine promoted an increase in

Fig. 2 Effect of 5-azacytidine treatment on adenosine A_{2A} receptor radioligand binding. Control and 5 μ M 5-azacytidine-treated (a) HeLa, (b) SH-SY5Y and (c) U87-MG cells for 48 h were incubated with different concentrations of [³H]ZM241385 and 5 mM theophylline after pre-incubation with adenosine deaminase in order to remove endogenous adenosine. Observations are mean \pm SEM values obtained from *n* (in brackets) separate experiments carried out in triplicate. Inset shows B_{max} and K_d values for control and treated cells. Significant increase in radioligand binding is found in 5-azacytidine-treated HeLa and SH-SY5Y cells when compared with baseline conditions, whereas no changes are seen in U87-MG-treated cells. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ significantly different from control values.

$A_{2A}R$ protein levels (Fig. 3a) without modifying the protein levels of NF κ B p65 subunit and B-Myb with respect to non-treated HeLa cells (Fig. 3b and c).



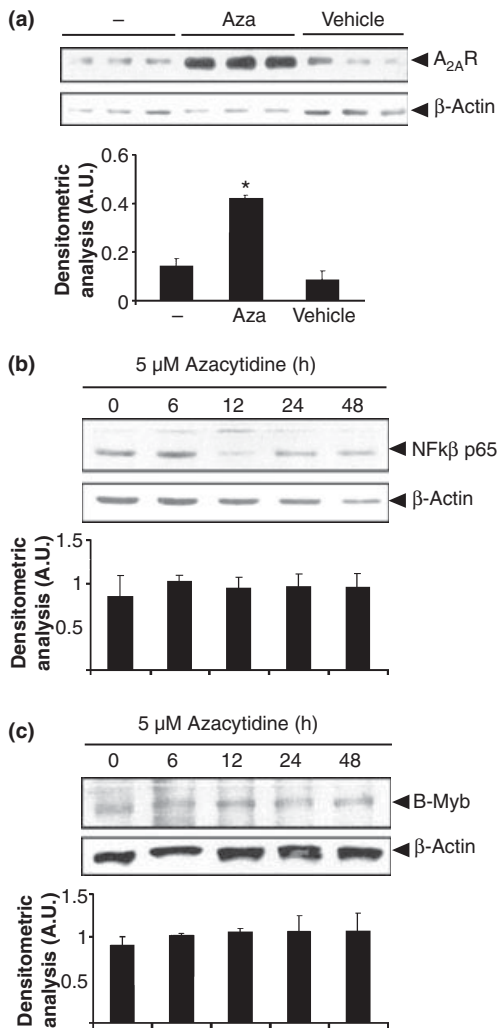


Fig. 3 Effect of 5-azacytidine treatment on transcription factors related with *ADORA2A* transcription. (a) 5-Azacytidine treatment for 48 h increased A_{2A}R protein levels (45 kDa) in HeLa cells. The blot shows three different samples for non-treated (-), treated (Aza) and vehicle-treated cells. Time course of 5-azacytidine treatment on HeLa cells for (b) NFκβ (65 kDa) and (c) B-Myb (110 kDa). The protein levels were detected by western blot. β-Actin (45 kDa) is blotted to control protein loading. The image is representative of three independent experiments. Densitometric analysis for A_{2A}R, NFκβ and B-Myb blots (mean ± SD) is shown below every image. AU, arbitrary units. **p* < 0.001 significantly different from control values. No differences are seen at any time point of azacytidine treatment versus non-treated cells for NFκβ and B-Myb (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test).

5-Azacytidine treatment reduces DNA methylation in 5' UTR of *ADORA2A*

Based on no changes in *ADORA2A* related-transcription factors after 5-azacytidine treatment, we proceeded to analyze the DNA methylation pattern of *ADORA2A* gene promoter using SEQUENOM MassArray platform. This method consists of the analysis of DNA methylation by

gene-specific amplification of bisulfite-treated DNA followed by *in vitro* transcription, base-specific cleavage and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight analysis without cloning of the PCR products (Ehrich *et al.* 2005). It must be pointed out that CpG sites very close to each other cannot be discriminated in the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight analysis and the percentage of DNA methylation is considered the same for each one. Moreover, base-specific cleavage generating long or very short fragments may under-estimate CpG sites in the PCR product. The DNA methylation pattern of *ADORA2A* was examined in HeLa, SH-SY5Y and U87-MG cells to learn whether the three predicted CGIs were methylated in basal conditions. For this purpose, we amplified six regions by PCR after genomic DNA bisulfite treatment (Table 2). The three predicted CGI were analyzed with PCRs numbers 1–4, and the sequences amplified are shown as Fig. S2. PCR 1 covers part of the CGI#1 and CGI#2, showing a high degree of DNA methylation in CpG sites 18–29, especially in HeLa cells (Fig. 4b, black bars). Because of the large size of CGI#2, an additional two overlapping PCRs (numbers 2 and 3) were necessary to study nearly all the DNA methylation pattern of this gene region (Figs 4c and S3a, black bars). Interestingly, the total content of methylcytosines in both amplified DNA sequences was higher in HeLa than in U87-MG cells and SH-SY5Y cells (Fig. S4a–c). Finally, CGI#3 (PCR 4) was highly methylated in all CpG sites in all three cell lines, being a bit higher in some CpG sites in U87-MG and SH-SY5Y cells (Figs S3b and S4d, black bars). An additional analysis was made in two 3' flanking sequences to CGI#3 covered by PCR 5 and PCR 6. Both DNA regions were found to be highly methylated in HeLa, SH-SY5Y and U87-MG cells (Figs 5b,c and S4e,f, black bars).

As expected, DNA methylation decreased in all loci studied after treatment with 5 μM 5-azacytidine for 48 h in HeLa and SH-SY5Y cells. Yet no modifications in methylation levels were observed in U87-MG cells (Figs 4b,c, 5b,c, S3 and S4, white bars).

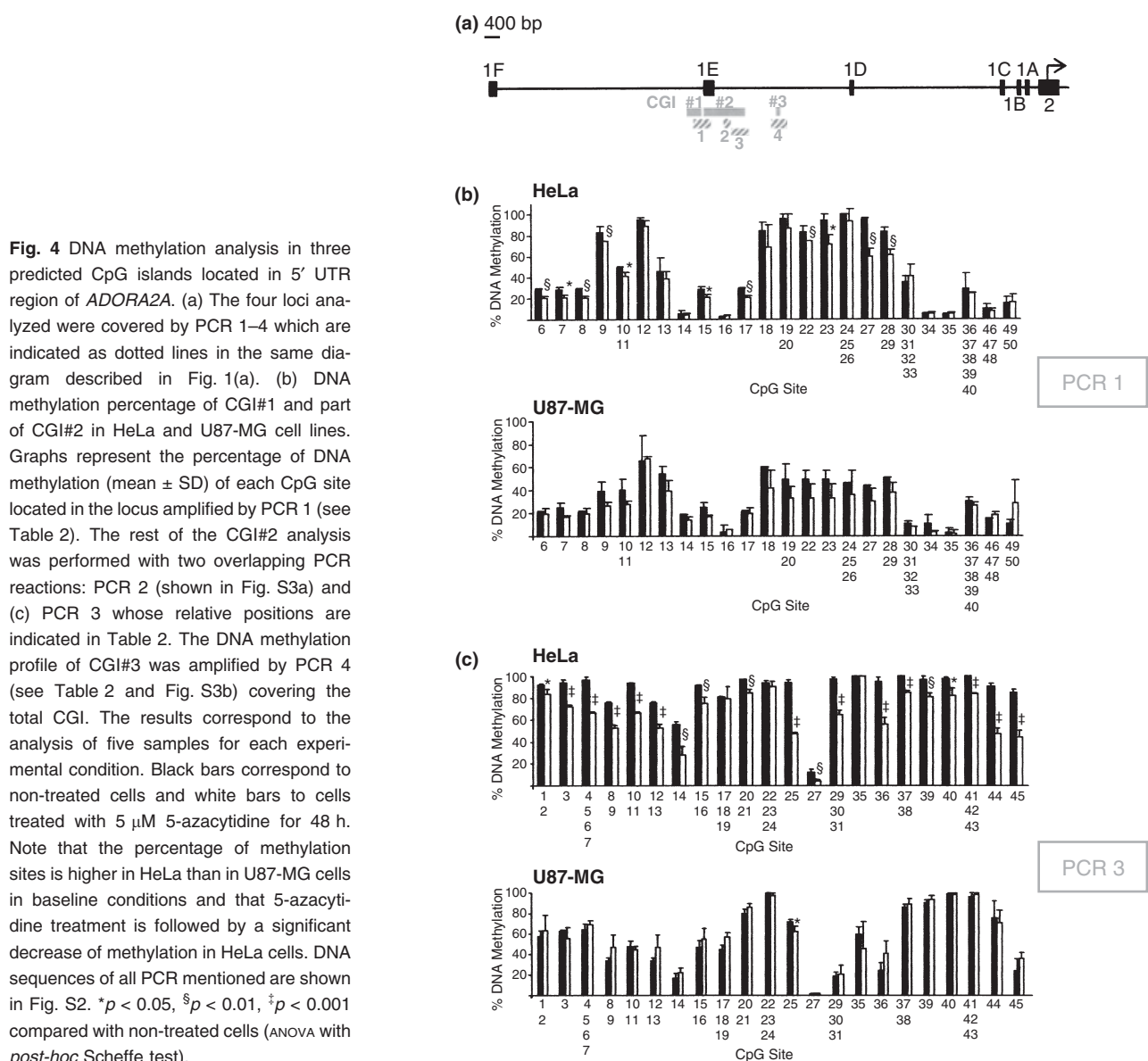
In an attempt to identify which CpG sites, if any, were the most critical in determining A_{2A}R expression, we looked for changes in the percentage of DNA methylation after 5-azacytidine treatment. These changes were statistically significant but small at many CpG sites. For practical purposes, we established three criteria for a CpG site to be identified as 'important': (i) loss of DNA methylation after 5-azacytidine treatment is statistically significant, (ii) the percentage of DNA methylation is greater in HeLa (or SH-SY5Y) control cells than in the corresponding control U87-MG (the most methylated of the three cell lines and not modulated by Aza), (iii) methylation in Aza-treated HeLa (or SH-SY5Y) cells is similar (i.e. not significantly different) to that measured in control U87-MG. The third criterion is undoubtedly the most difficult to establish, as the minimum percentage of DNA methylation lost necessary to promote

Table 2 PCRs carried out in 5' UTR regions of *ADORA2A* to analyze the percentage of DNA methylation in HeLa, SH-SY5Y and U87-MG cell lines

	Localization in human lgenomic contig NT_011520	Position respect to ATG site (exon 2) ^a	Sequence length (bp) ^b	Annealing temperature (°C)
PCR 1	4209874–4210419	–10069/–9524	546	60
PCR 2	4210725–4210992	–9218/–8951	268	58
PCR 3	4210970–4211473	–8973/–8470	504	62
PCR 4	4212060–4212568	–7883/–7375	509	62
PCR 5	4213300–4213802	–6643/–6141	503	60
PCR 6	4214642–4215133	–5301/–4810	492	62

^aHuman *ADORA2A* mRNA (GenBank number NM_000675) was aligned with human genomic sequence, establishing that ATG is located at position 4219943 (contig GenBank number NT_011520).

^bThe PCR product length contains an additional 41 bp corresponding to the tag length incorporated in every forward and reverse primer (underlined sequences; see Material and Methods section).



gene transcription has not been established. The result of such analysis (Table S1) is that some CpG sites located in regions covered by PCR 1, PCR 2 and PCR 3 (i.e. CGI#1 and CGI#2) seems to contribute to A_{2A}R expression in HeLa cells, while PCR 1 and PCR 5 are more determining in SH-SY5Y cells.

5-Azacytidine treatment reduces MeCP₂ binding to 5' UTR of ADORA2A

To confirm that DNA methylation lost in ADORA2A was the molecular mechanism implied in its up-regulation after 5-

azacytidine treatment, we carried out a quantitative chromatin immunoprecipitation assay (qChIP) for the methyl-CpG-binding protein MeCP₂ in HeLa cells. After the ChIP, four different loci in the 5' UTR of ADORA2A were amplified, all located outside the PCR regions for DNA methylation analyses (Table 3, Fig. S5). The assay revealed that MeCP₂ reduces its affinity for ADORA2A after 5-azacytidine treatment (Fig. 6). The specificity of the antibody was confirmed, as no DNA immunoprecipitation was obtained with a rabbit serum (IgG).

SAM treatment reduces ADORA2A expression in U87-MG and SH-SY5Y cells

The role of methylation in ADORA2A gene expression was further investigated by means of radioligand binding assays using 30 nM [³H]ZM 241385 in control and S-adenosyl-L-methionine treated cells (100 μM SAM for 48 h) 1 day after plating. Analysis of 5-azacytidine treated cells (5 μM Aza, 48 h) was repeated in the same set of assays. As shown in Fig. 7(a), specific [³H]ZM 241385 binding was significantly decreased in treated U87-MG cells, while A_{2A}R levels in HeLa and SH-SY5Y cells were unaltered by SAM. The Aza treatment effect was similar to that obtained in saturation curves shown before (Fig. 2). Next, we followed a procedure which is drawn in Fig. 7(e). Four days after plating, cells were treated with 100 μM SAM for 24 (Fig. 7b) or 48 h (Fig. 7c). Under these conditions, A_{2A}Rs were unaltered after SAM treatment in HeLa cells and decreased in SH-SY5Y and U87-MG cells. However, specific binding was significantly lower in SAM treated SH-SY5Y cells at 24 and 48 h of treatment (74% and 78% of control, respectively) than in HeLa cells. Interestingly, comparison of specific binding in control cells at different days *in vitro* after plating revealed a gradual increase in specific binding to A_{2A} receptor with time of culture in both HeLa and SH-SY5Y cells which was absent in U87-MG cells (Fig. 7d). In parallel, we performed the same analysis at mRNA level in U87-MG cells. HeLa cells were not SAM-treated because of their reduced basal A_{2A}R mRNA levels (Fig. S1a). The

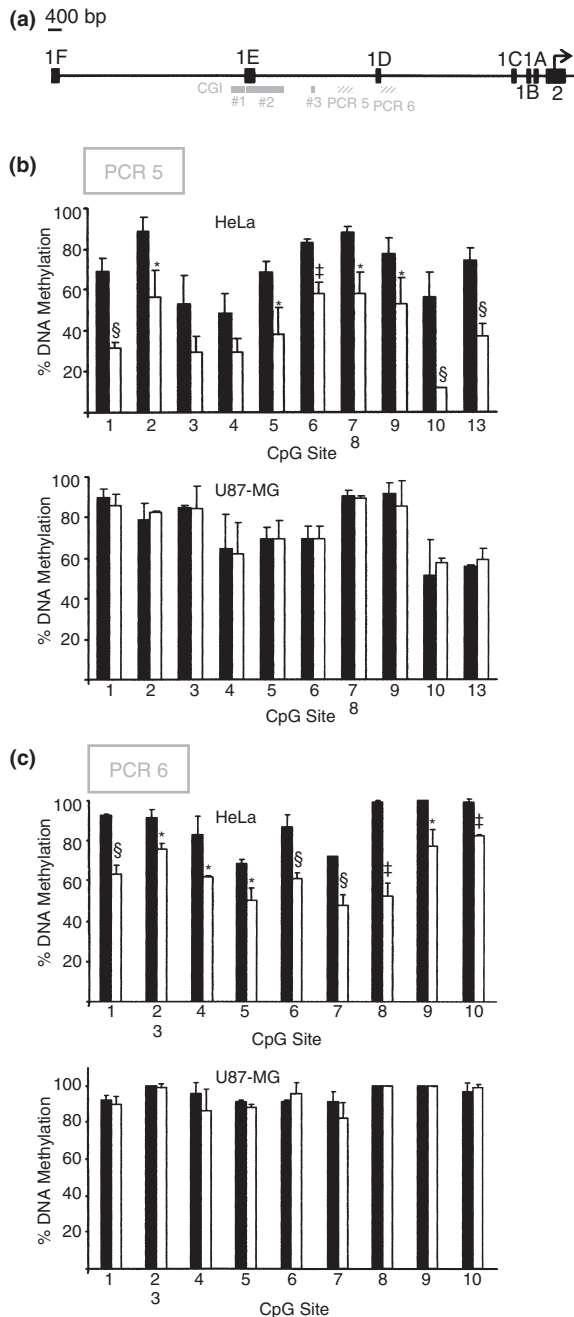


Fig. 5 DNA methylation analysis of two non-CpG island regions. (a) The two loci analyzed were covered by PCR 5 and PCR 6. Both sequences studied are indicated in the same diagram described in Fig. 1(a). (b) DNA methylation percentage of both non-CpG island regions was analyzed in HeLa and U87-MG cell lines. Graphs represent the percentage of DNA methylation (mean ± SD) of each CpG site located in the locus amplified by PCR 5 and (c) PCR 6 whose positions are indicated in Table 2. Black bars correspond to non-treated cells and white bars to cells treated with 5 μM 5-azacytidine for 48 h. The results correspond to the analysis of five samples for each experimental condition. Note that 5-azacytidine treatment is followed by significant decrease of methylation in HeLa cells. **p* < 0.05, §*p* < 0.01, ‡*p* < 0.001 compared with non-treated cells (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test).

Table 3 PCRs carried out in 5' UTR region of *ADORA2A* to quantify the MeCP₂ ChIP

Oligos name	Primer forward (5' → 3')	Primer reverse (5' → 3')	PCR product length (bp)
-5693	AGGAGGGCTGTCAGGTGAA	CCATGTGTCCGGCTAGGG	100
-6686	ATCAGGTGGAGAGAGGAGCA	AGCAGAGAAAATGCCCGAAG	105
-8427	CCTTGTGGAGGGTGAGC	ACCTGGCAATAGGGGAGAAG	108
-10885	GGAGGATCAAGGCCACT	GATGTGTCCCAATTTCCAA	110

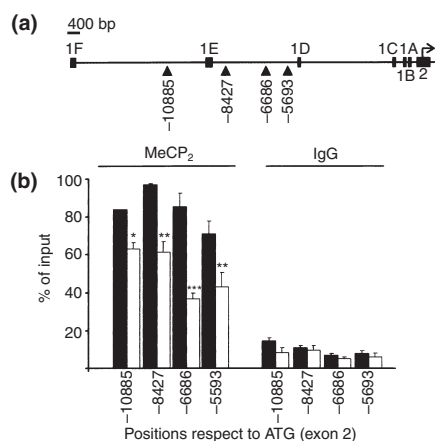


Fig. 6 Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) with MeCP₂ in 5-azacytidine-treated HeLa cells. ChIP analysis carried out in non-treated (black bars) and 5 μ M 5-azacytidine (Aza)-treated for 48 h (white bars) HeLa cells with an anti-MeCP₂ and rabbit serum (IgG). % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of three samples for every experimental condition. The image is representative of two independent analyses. Primer sequences and position are indicated in Table 3 and Fig. S5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with non-treated cells (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test).

SAM-treated promoted, as is shown in Fig. 7(e), a significant reduction of A_{2A}R mRNA isoform E, while isoform A was not modified (Fig. 8a). Interestingly, the same strategy was carried out as in Fig. 6. A qChIP was performed in SAM-treated U87-MG showing that MeCP₂ affinity for *ADORA2A* is increased (Fig. 8b). The specificity of the antibody was confirmed, as no DNA immunoprecipitation was obtained with a rabbit serum (IgG). It is noteworthy that there is a reduced binding of MeCP₂ for *ADORA2A* in basal conditions, as the specific immunoprecipitation behaves in the same way as rabbit serum.

Discussion

DNA methylation is one of the most important mechanisms for epigenetic silencing in mammals and it occurs mainly in cytosines that precede guanines, in the well-known dinucleotide CpG sites. The CpG-rich regions present lengths of 0.5 to several kb, and are called CGIs (Illingworth and Bird 2009). Most CGIs are located in the 5' UTR regions and the

first exon (Jones 1999). Generally, active transcription regions have a majority of CGIs unmethylated, while transcriptionally silent regions have mostly methylated CpG sites (Illingworth and Bird 2009). Methylation of CGIs is usually accompanied by post-translational histone modifications which further modulate gene expression (Lopez-Serra and Esteller 2008).

The present report shows for the first time that DNA methylation plays a role in the endogenous expression of A_{2A}R. We have shown the presence of three CGIs in the human 5' UTR *ADORA2A* surrounding exon 1E which is included in the largest CGI, already described (Yu *et al.* 2004). However, as there is only a 30 bp gap between CGI#1 and CGI#2, each CGI could be seen as a unique CGI. All these CGIs are highly methylated in HeLa and to a lesser degree in U87-MG and SH-SY5Y cells. This property inversely correlates with A_{2A}R mRNA expression levels which are lower in HeLa cells with respect to U87-MG and SH-SY5Y cells. 5-Azacytidine treatment is accompanied by decreased DNA methylation in all CGIs and most CpG sites analyzed along the 5' UTR sequence in HeLa cells, and this is further accompanied by increased expression levels of A_{2A}R mRNA in these cells, especially isoform E in HeLa and SH-SY5Y cells. These findings reinforce the functional role of the large CGI found surrounding exon 1E. In contrast, there is no apparent effect of 5-azacytidine on U87-MG cells in which mRNA levels are altered in an unspecific way and behave as the vehicle does. Importantly, increased A_{2A}R mRNA expression levels induced by 5-azacytidine in HeLa and SH-SY5Y cells are accompanied by increased surface expression of A_{2A}R protein as derived from radioligand binding assays and western blot. Moreover, we entertained the possibility that the effects of 5-azacytidine were indirect through the induction of some transcription factor. It is worth noting that few studies have focused on *ADORA2A* gene regulation (St. Hilaire *et al.* 2009). In the present report, we only tested the expression levels of two transcription factors related with *ADORA2A* gene expression without finding variations after 5-azacytidine treatment in HeLa cells. Another possibility was the implication of cAMP-response element binding protein (CREB), as it has been described as an activator of A_{2A}R expression (Chiang *et al.* 2005). Interestingly, limited binding of phospho-CREB to methylated target gene promoters has been reported (Yossifoff *et al.* 2008; Sunahori *et al.* 2009). All together, this might

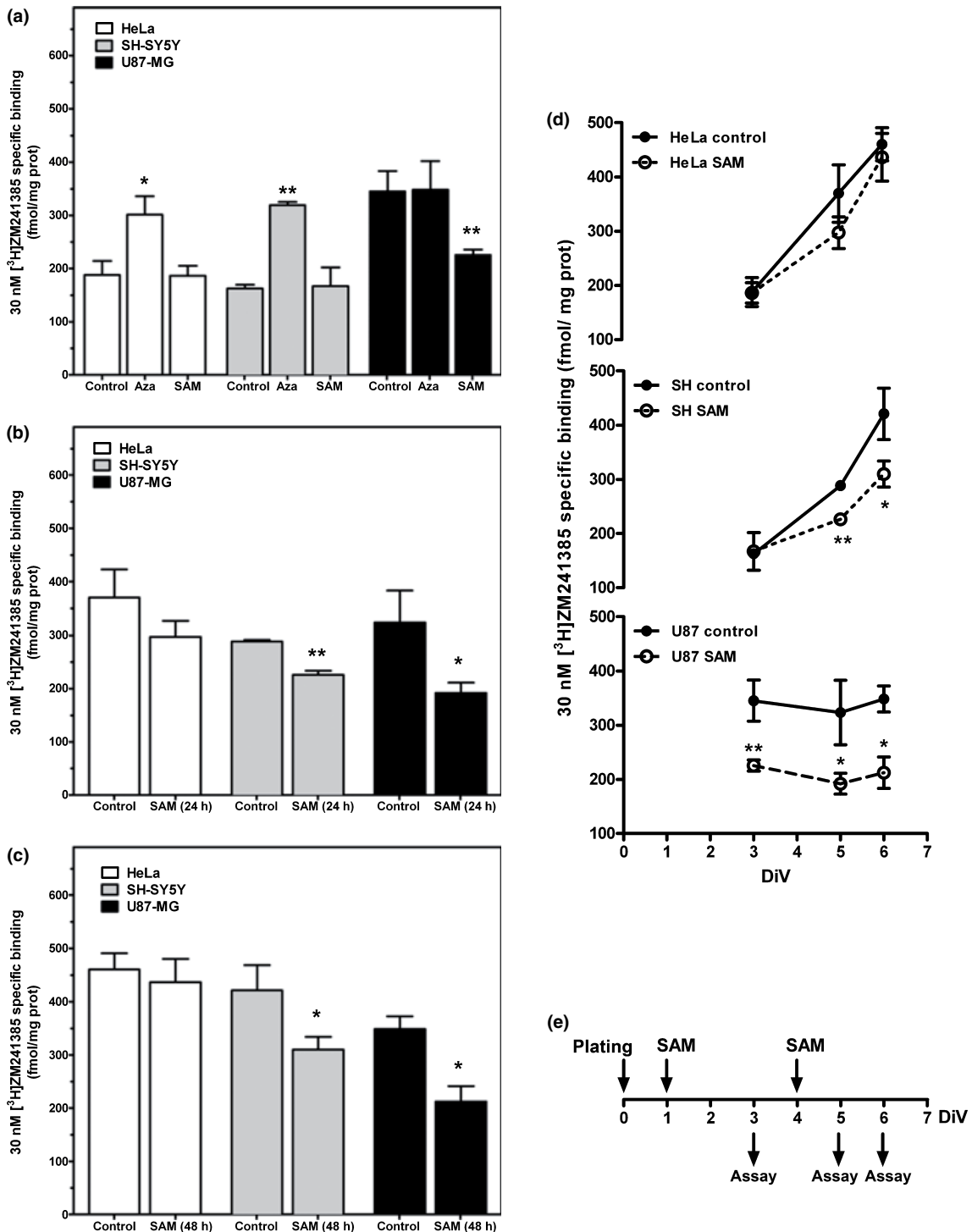


Fig. 7 Effect of 5-azacytidine and *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) treatment on adenosine A_{2A} receptor radioligand binding. Control and 5 μ M 5-azacytidine (Aza) or 100 μ M SAM treated cells were incubated with 30 nM [³H]ZM241385 after pre-incubation with adenosine deaminase in order to remove endogenous adenosine. Panel (a) reflects specific binding after 48 h of treatment started 1 day after plating. Panels (b) and (c) show data obtained after 24 and 48 h,

respectively, of SAM exposure started 4 days after plating. Panel (d) shows the relationship between receptor level and days *in vitro* (DIV). Panel (e) summarizes procedure employed in this set of experiments. Observations are mean \pm SEM values obtained from at least three separate experiments carried out in triplicate. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ significantly different from control values.

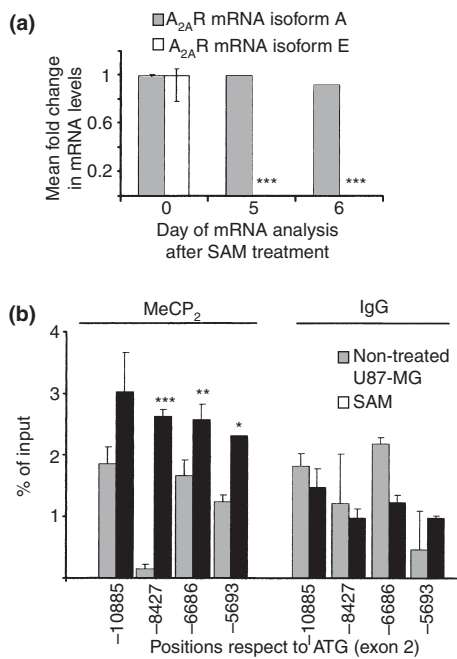


Fig. 8 Effect of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) treatment on adenosine *A_{2A}R* mRNA levels in U87-MG cells. U87-MG cell lines were treated with 100 μ M SAM as explained in the Fig. 7(e). (a) Mean fold change in *A_{2A}R* mRNA isoforms A and E (gray and white bars, respectively) after SAM treatment. The analysis was performed with SyBrGreen PCR, and β -glucuronidase (GUSB) was used as endogenous control for normalization. Mean fold change calculation as well as specific set of primers are indicated in Material and Methods section. Treatments were performed in triplicate (6-well plates) in two independent experiments. (b) ChIP analysis carried out in non-treated (grey bars) and 100 μ M SAM-treated (black bars) U87-MG cells with an anti-MeCP₂ and rabbit serum (IgG). The treatment was performed as indicated in Fig. 7(e) and the ChIP was carried out on day 6. % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of three samples for every experimental condition. The image is representative of two independent analyses. Primer sequences and position are indicated in Table 3 and Fig. S5. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with non-treated cells (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test).

indicate a putative role for CREB as the mechanism that could induce *A_{2A}R* levels in HeLa cells after 5-azacytidine treatment, as high phospho-CREB levels were found in basal HeLa cells (data not shown). However, the participation of some other unknown transcription factor is also plausible. Protein kinase C activity has been associated with the induction of *A_{2A}R* mRNA levels in SH-SY5Y (Peterfreund *et al.* 1997). Therefore it is also plausible that protein kinase C activity is related with *A_{2A}R* increase after 5-azacytidine treatment in these cells.

Thus, the present observations show a relationship between high percentages of CpG methylation sites in *ADORA2A* promoter, sensitivity to demethylation of CGIs with 5-azacytidine and increase of *A_{2A}R* mRNA and protein

expression levels in 5-azacytidine-treated HeLa and SH-SY5Y cells. The lack of effect of 5-azacytidine treatment in U87-MG may be related to several causes, including differences in basal levels of CpG methylation, and to susceptibility to 5-azacytidine at the particular time-points examined in the present study. It is worth noting that 5-azacytidine is only active in *S*-phase cells incorporating in DNA instead of cytosine (Constantinides *et al.* 1977). In line with this, U87-MG cells proliferate much slower than HeLa and SH-SY5Y cells do, so this might represent one explanation of azacytidine different effect among these cell lines.

Regarding the percentage of DNA methylation lost after 5-azacytidine treatment, it was statistically significant but small at many CpG sites. However, the minimum percentage of DNA methylation loss necessary to promote gene transcription has not been established. There is only one study that, to our knowledge, attempts to measure variations of mRNA levels after 5-azacytidine treatment using MassArray platform. The authors describe 10–50% of DNA methylation lost in several genes after 5-azacytidine treatment in Kasumi-1 cells, concluding that this percentage of DNA methylation loss is enough to promote an increase in the specific mRNA levels (Flotho *et al.* 2009). Moreover, it must take into account that DNA methylation occurs in the CpG sites interfering with gene expression in two ways. The first is interference with the binding of transcription factors to DNA through the methyl group. The second is caused by the binding of specific proteins (methyl-binding proteins, MBPs), such as MeCP₂, MBD1 and MBD2, to methyl CpG sites (Ballestar and Wolffe 2001). The qChIP assay that we have carried out with an antibody anti-MeCP₂ has clearly shown the loss of MeCP₂ affinity for *ADORA2A* after 5-azacytidine treatment in HeLa cells, demonstrating the role of DNA methylation in its transcriptional regulation. The same conclusion has been achieved in the analysis of SAM-treated U87-MG. Again, the role of *ADORA2A* methylation is confirmed, as isoform E is highly reduced after SAM treatment in these cells. Moreover, there is also shown to be a higher affinity of MeCP₂ for *ADORA2A* after SAM treatment in these cells. Interestingly, the ChIP assays carried out in basal conditions with the antibody anti-MeCP₂ and the rabbit serum are very similar, correlating with the low percentage of basal methylation detected in U87-MG cells. Regarding HeLa cells, SAM treatment did not have any effect on *A_{2A}R* expression as its endogenous mRNA levels are much reduced because of the high percentage of DNA methylation found in the 5' UTR *ADORA2A* gene region.

It is well established that CpG islands' hypermethylation profile of tumor-suppressor genes varies according to the tumor type (Costello *et al.* 2000). Certainly, the basal methylation profile varies among the three cell lines tested. Moreover, CGIs are usually unmethylated in normal cells (Weber *et al.* 2007), while hypermethylation of CGIs is a

major event in the pathogenesis of many cancers (Herman and Baylin 2003). As the study was performed in tumorous cells, we do not know, at present, whether the analyzed methylated CGIs in *ADORA2A* in HeLa, U87-MG and SH-SY5Y cell lines are also methylated in normal human cells, including neurons of the striatum and peripheral tissues. This aspect is particularly important in certain human diseases of the nervous system, as human postmortem studies have revealed increased striatal A_{2A}R levels in Parkinson's disease and schizophrenia (Deckert *et al.* 2003; Calon *et al.* 2004), and in the frontal cortex in Pick disease (Albasanz *et al.* 2006). We recently described how human postmortem brain is suitable to perform DNA methylation analysis and how the postmortem delay does not modify the DNA methylation pattern of *ADORA2A* (Barrachina and Ferrer 2009). Studies are needed to analyze the methylation status of *ADORA2A* in the human brain in basal and diseased conditions in order to understand, and perhaps manipulate, the regulation of A_{2A}R as a mechanism of therapeutic intervention. Indeed, it has been proposed to use SAM in the treatment of Alzheimer's disease (Scarpa *et al.* 2003). Its administration to cell lines down-regulates presenilin 1 gene and reduces β -amyloid production (Fuso *et al.* 2005). In contrast, deprivation of SAM up-regulates presenilin 1 gene, increasing β -amyloid deposits in β -amyloid precursor protein transgenic mice (Fuso *et al.* 2008). Therefore, the present report provides increased understanding of epigenetic regulation of *ADORA2A* that may have therapeutic implications in inflammation and in certain neurological diseases.

Acknowledgements

There is no conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations. We are grateful to Dr. Esteban Ballestar for helpful comments on qChIP assay. We thank T. Yohannan for editorial help.

This study was funded by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (PI05/1631 and CP08/00095) to M.B., and from the European Union through the Marie-Curie Research Training Network PRAIRIES (Contract MRTN-CT-2006-035810), the Consejería de Educación y Ciencia (PCI08-0125), the Consejería de Sanidad-FISCAM (PI-2007/50 and G-2007-C/13) of the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha and the Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00138) to M.M. S.P.B is the recipient of a grant from the University of Barcelona to complete her doctoral thesis.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. (a) Basal A_{2A}R mRNA levels (mean \pm SD) in HeLa, SH-SY5Y and U87-MG cells. The analysis was performed in triplicate. AU: Arbitrary Units. **p* < 0.001 compared with HeLa

cells (ANOVA with *post-hoc* Scheffe test). (b) Representative standard curves for A_{2A}R and GUSB.

Figure S2. DNA sequences analyzed in Figs 4, S3 and S4, which cover CGI#1, CGI#3 and nearly all CGI#2.

Figure S3. (a) DNA methylation percentage of a locus in CGI#2 in HeLa and U87-MG cell lines.

Figure S4. The same analysis carried out in Figs 4 and S3 but in SH-SY5Y cells.

Figure S5. Scaled diagram of the 5' UTR region of *ADORA2A* indicating the positions amplified by *real time* PCR to analyze the ChIP performed with anti-MeCP₂.

Table S1. Attempt to identify key CpG sites in determining A_{2A}R expression.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

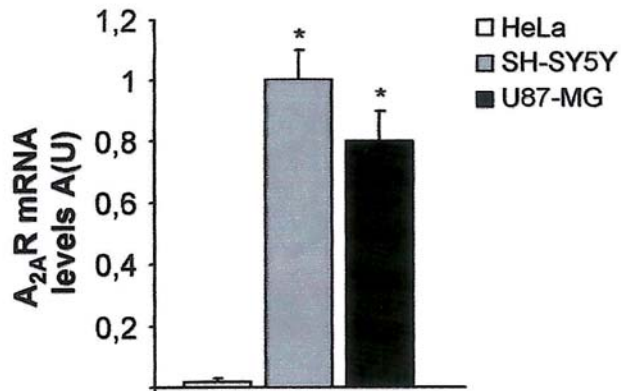
References

- Albasanz J. L., Rodríguez A., Ferrer I. and Martín M. (2006) Adenosine A_{2A} receptors are up-regulated in Pick's disease frontal cortex. *Brain Pathol.* **16**, 249–255.
- Ballestar E. and Wolffe A. P. (2001) Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1–6.
- Bara-Jimenez W., Sherzai A., Dimitrova T., Favitt A., Bibbiani F., Gillespie M., Morris M. J., Mouradian M. M. and Chase T. N. (2003) Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* **61**, 293–296.
- Barrachina M. and Ferrer I. (2009) DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in post-mortem brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 880–891.
- Calon F., Dridi M., Hornykiewicz O., Bédard P. J., Rajput A. H. and Di Paolo T. (2004) Increased adenosine A_{2A} receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* **127**, 1075–1084.
- Chen J. F., Huang Z., Ma J., Zhu J., Moratalla R., Standaert D., Moskowitz M. A., Fink J. S. and Schwarzschild M. A. (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J. Neurosci.* **19**, 9192–9200.
- Chiang M. C., Lee Y. C., Huang C. L. and Chern Y. (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A_{2A} adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J. Biol. Chem.* **280**, 14331–14340.
- Constantinides P. G., Jones P. A. and Gevers W. (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* **267**, 364–366.
- Costello J. F., Frühwald M. C., Smiraglia D. J. *et al.* (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* **24**, 132–138.
- Cunha R. A., Ferré S., Vaugeois J. M. and Chen J. F. (2008) Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1512–1524.
- Deckert J., Brenner M., Durany N. *et al.* (2003) Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *Neuroreport* **14**, 313–316.
- Ehrlich M., Nelson M. R., Stanssens P., Zabeau M., Liloglou T., Xinarianos G., Cantor C. R., Field J. K. and van den Boom D. (2005) Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation pat-

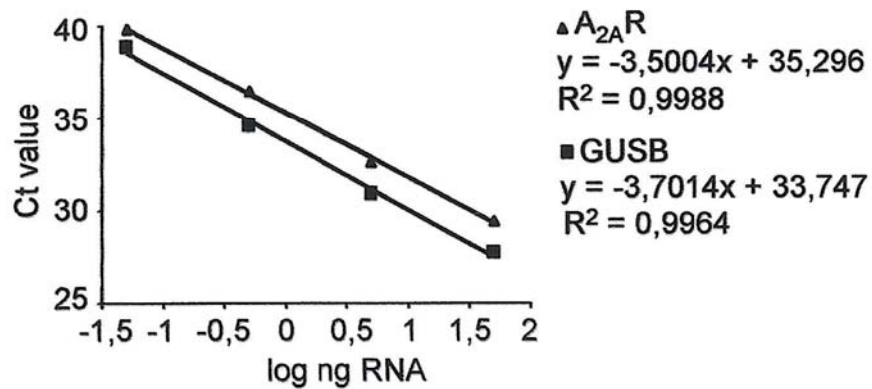
- terms by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 15785–15790.
- Ferré S. (1997) Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* **133**, 107–120.
- Ferre S., von Euler G., Johansson B., Fredholm B. B. and Fuxe K. (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 7238–7241.
- Flotho C., Claus R., Batz C., Schneider M., Sandrock I., Ihde S., Plass C., Niemeyer C. M. and Lübbert M. (2009) The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**, 1019–1028.
- Fredholm B. B., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N. and Linden J. (2001) International Union of Pharmacology XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* **53**, 527–552.
- Fredholm B. B., Chen J. F., Cunha R. A., Svenningsson P. and Vaugeois J. M. (2005a) Adenosine and brain function. *Int. Rev. Neurobiol.* **63**, 191–270.
- Fredholm B. B., Chen J. F., Masino S. A. and Vaugeois J. M. (2005b) Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 385–412.
- Fuso A., Seminara L., Cavallaro R. A., D'Anselmi F. and Scarpa S. (2005) S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 195–204.
- Fuso A., Nicolia V., Cavallaro R. A., Ricceri L., D'Anselmi F., Coluccia P., Calamandrei G. and Scarpa S. (2008) B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **37**, 731–746.
- Herman J. G. and Baylin S. B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042–2054.
- Illingworth R. S. and Bird A. P. (2009) CpG islands – “A rough guide”. *FEBS Lett.* **583**, 1713–1720.
- Jones P. A. (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**, 34–37.
- Jones P. A., Smith R. A. and Stone T. W. (1998) Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A2A receptor antagonist. *Brain Res.* **800**, 328–335.
- Kreth S., Ledderose C., Kaufmann I., Groeger G. and Thiel M. (2008) Differential expression of 5'-UTR splice variants of the adenosine A2A receptor gene in human granulocytes: identification, characterization, and functional impact on activation. *FASEB J.* **22**, 3276–3286.
- Le F., Townsend-Nicholson A., Baker E., Sutherland G. R. and Schofield P. R. (1996) Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: *ADORA2A*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 461–467.
- LeWitt P. A., Guttman M., Tetrud J. W., Tuite P. J., Mori A., Chaikin P. and Sussman N. M., 6002-US-005 Study Group (2008) Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces “off” time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Ann. Neurol.* **63**, 295–302.
- Lopez-Serra L. and Esteller M. (2008) Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br. J. Cancer* **98**, 1881–1885.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall D. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Lukashev D., Ohta A., Apasov S., Chen J. F. and Sitkovsky M. (2004) Cutting edge: physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J. Immunol.* **173**, 21–24.
- MacCollin M., Peterfreund R., MacDonald M., Fink J. S. and Gusella J. (1994) Mapping of a human A2a adenosine receptor (*ADORA2A*) to chromosome 22. *Genomics* **20**, 332–333.
- Murphree L. J., Sullivan G. W., Marshall M. A. and Linden J. (2005) Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem. J.* **391**, 575–580.
- Ohta A. and Sitkovsky M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **414**, 916–920.
- Ohta A., Gorelik E., Prasad S. J. *et al.* (2006) A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 13132–13137.
- Perez-Buira S., Barrachina M., Rodriguez A., Albasanz J. L., Martín M. and Ferrer I. (2007) Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci. Lett.* **423**, 194–199.
- Peterfreund R. A., MacCollin M., Gusella J. and Fink J. S. (1996) Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J. Neurochem.* **66**, 362–368.
- Peterfreund R. A., Gies E. K. and Fink J. S. (1997) Protein kinase C regulates adenosine A2a receptor mRNA expression in SH-SY5Y cells. *Eur. J. Pharmacol.* **336**, 71–80.
- Popoli P., Pintor A., Domenici M. R. *et al.* (2002) Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *J. Neurosci.* **22**, 1967–1975.
- Ruiz M. A., Escriche M., Lluís C., Franco R., Martín M., Andrés A. and Ros M. (2000) Adenosine A(1) receptor in cultured neurons from rat cerebral cortex: colocalization with adenosine deaminase. *J. Neurochem.* **75**, 656–664.
- Scarpa S., Fuso A., D'Anselmi F. and Cavallaro R. A. (2003) Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett.* **541**, 145–148.
- Schwarzschild M. A., Agnati L., Fuxe K., Chen J. F. and Morelli M. (2006) Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **29**, 647–654.
- Simola N., Morelli M. and Pinna A. (2008) Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1475–1489.
- St. Hilaire C., Carroll S. H., Chen H. and Ravid K. (2009) Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *J. Cell. Physiol.* **218**, 35–44.
- Sunahori K., Juang Y. T. and Tsokos G. C. (2009) Methylation status of CpG islands flanking a cAMP response element motif on the protein phosphatase 2Ac alpha promoter determines CREB binding and activity. *J. Immunol.* **182**, 1500–1508.
- Weber M., Hellmann I., Stadler M. B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M. and Schübeler D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457–466.
- Yossifoff M., Kisliouk T. and Meiri N. (2008) Dynamic changes in DNA methylation during thermal control establishment affect CREB binding to the brain-derived neurotrophic factor promoter. *Eur. J. Neurosci.* **28**, 2267–2277.
- Yu L., Frith M. C., Suzuki Y. *et al.* (2004) Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res.* **1000**, 156–173.

Supporting information S1.

A



B



78x88mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supporting information S2.

CGI #1 (PCR 1)

CGAGCTGAC CAACATGGT AAACAC¹CTC TCTACTAAAA AATACAAAG TTACC²GGGC³
⁴GTGOTGG⁵ G⁶CCCTGTAA TCCAGCTAC T⁷CGGAGGCT GAGGCAGGAG AAT⁸CCCTTGA
⁹ACC¹⁰GGGAGG TGGAGTTGC AGTGAG¹¹CCGA GAT¹²CGCCA CTGCATCCA G¹³CTGGG¹⁴CGA
AAGACCAAGA GT¹⁵CCCTCA AAAAAAGAA AGAGGGAGTG TGGGGTGGG G¹⁶CCCGAG¹⁷C
CTCCAGGGG C¹⁸GGGAAGGG GACTCCAGG C¹⁹CGAGGACT C²⁰TGGAAAGG AGTGAAGT
²¹GG²²CTGAGG AAG²³CG²⁴GG ACC²⁵GAT²⁶CGA C²⁷CCGGAGG A²⁸CC²⁹CTGG G³⁰GGCC³¹CGA
³²GG³³GGGATG TG³⁴CC³⁵GT CAGGCC³⁶CGT G³⁷CCCT³⁸CT C³⁹TGCAGGG ACACCT⁴⁰CGG
⁴¹GAT⁴²CTCCTT CCAGGAT⁴³CC CTC⁴⁴GGCCT C⁴⁵CGGCGA T⁴⁶GCCT⁴⁷GGT C⁴⁸CCCTC⁴⁹CG
⁵⁰CCT⁵¹CTTTC T⁵²CG⁵³CAGC G⁵⁴GG⁵⁵GGGC G⁵⁶GGGCAG⁵⁷CG C⁵⁸GGTCTCAA AGCTGCCTGC
AGGGGG

CGI #2 (PCR 2)

CCTGTGAAG GCCCAGGCAC A¹GTCA²CTCC CAGGC³CAGT T⁴CG⁵CGCC⁶CTCC⁷GGAC
⁸CCT⁹CGAGCT GTCCCAACT GCAC¹⁰CGAAG C¹¹CGCGAGG GTAG¹²CGGG AGGGAAGCCA
¹³AGT¹⁴CG¹⁵CG C¹⁶CG¹⁷CG C¹⁸GGGTC¹⁹CG GAGC²⁰CGAGG TAG²¹CGGG G²²AG²³CG²⁴CG
T²⁵CGTCAGTC G²⁶TC²⁷CTCG TCCAT²⁸CGA C²⁹CGAGCC³⁰CG C³¹CG³²CGCT C³³CGATGAAC
³⁴T³⁵CGCGAGCT CCTCCAGCAG GGATGGAC

CGI #2 (PCR 3)

GAGCTCCTCC AGCAGGGATG GAC¹CGGGCC² GCAGAG³CGC TTCCTGAGGG GTGC⁴CGCC⁵
⁶GG⁷CCCG⁸GG G⁹CG¹⁰GGGAGA TTCCCCAGT GGAGGAG¹¹CG G¹²CG¹³CGAGAC¹⁴ GTTCCCG¹⁵CG
GAAGGTGAGG G¹⁶CG¹⁷GGCAGA GATACC¹⁸CGAG C¹⁹CG²⁰CGGHC²¹CG²²CGAAGAA AGGGGGAATC
AGGA²³CTGT GGC²⁴CGAG²⁵CG T²⁶GG²⁷CTTTC C²⁸GTGACAGT G²⁹TCC³⁰CGGA ACTGGGTTTG
GGGACCCAG GAG³¹CG³²CGG GGA³³CG³⁴ATG GGGTGGGTG³⁵ G³⁶CG³⁷CGCT³⁸CG ACTGGCC³⁹CG
⁴⁰GC⁴¹CTGTCTG TGGCTGCC⁴²CG GAG⁴³CGAGGT AGGAATGG⁴⁴CG GGAATGGTGG⁴⁵ C⁴⁶CG⁴⁷CT⁴⁸CGA
GGGATTTGG⁴⁹CG C⁵⁰CG⁵¹GGGCG CCAAGGCGTT GAGGAGGAGG⁵² C⁵³CG⁵⁴CGCC⁵⁵CG C⁵⁶CGAGCTGA
G⁵⁷TCCCTGTG TCC⁵⁸CGACTC AGACTTTAGT TGCCCG⁵⁹ACT GTACCATGGG AGGAAGAGGG
AGACCCAGGG CTGGGTCCTA GGCT

CGI #3 (PCR 4)

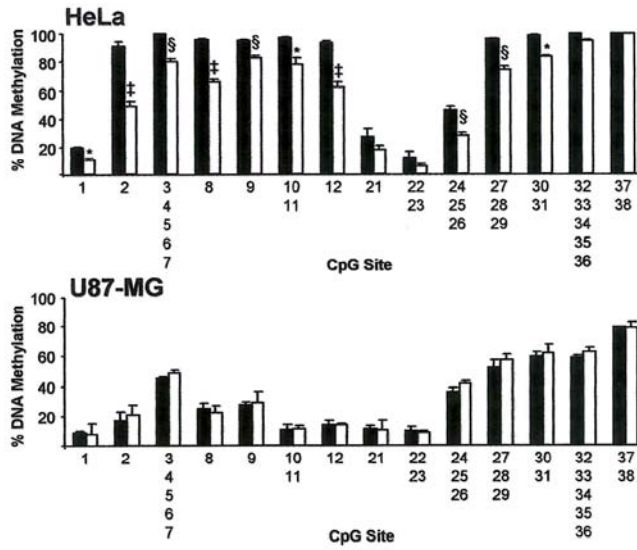
TCCCCAGTC TGAGCTGGCT GAGCTGTGAG CTTTCTGCT CTTGCTCA GGAAGCCAGG
GGCAGCCCAG TCACCTCTGG C¹CGAGGG²CG GCCTTAGGCC AAGGCTGACC TGGCTGGTCT
GAGAGCTGTG CTGGGCTTCT TCCATATCA GTCTGTGAAT TACAGATCCC CAATATGCC
³CT⁴CG⁵CG⁶CG ATGGAGGAGG GCAATCAATG GCAATGACTG CCTCATGGGC⁷ AAC⁸CG⁹ATGT
GCTGGAGATT TCAGTGCTCT¹⁰ G¹¹CTGGGTT CTGGTCTTGC CTCT¹²CGACC CACT¹³CGTGA
GCAGGTGCT GTCC¹⁴CGGGA ATCTGATATC TCATCTGTAG AACAGGATG ATGATCTTAG
CAATGCCTAA TGTGGAAAGG CCTTGGCTTG GGAGCAAGTG GGGGAAGTT TAGGGCAGAC
CAGAGGGCC¹⁵CG GTGAGGGGTG TGTGCTGGAG¹⁶ C¹⁷GGGAACC¹⁸CG G¹⁹GGAGGAGG GTGTTAGGCT
TGAGGGTCAG GGGACACCAC AGGGATTGC

74x169mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

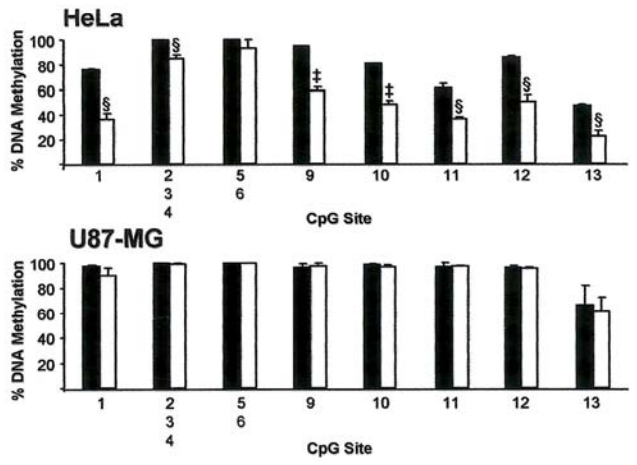
Supporting information S3.

A



PCR 2

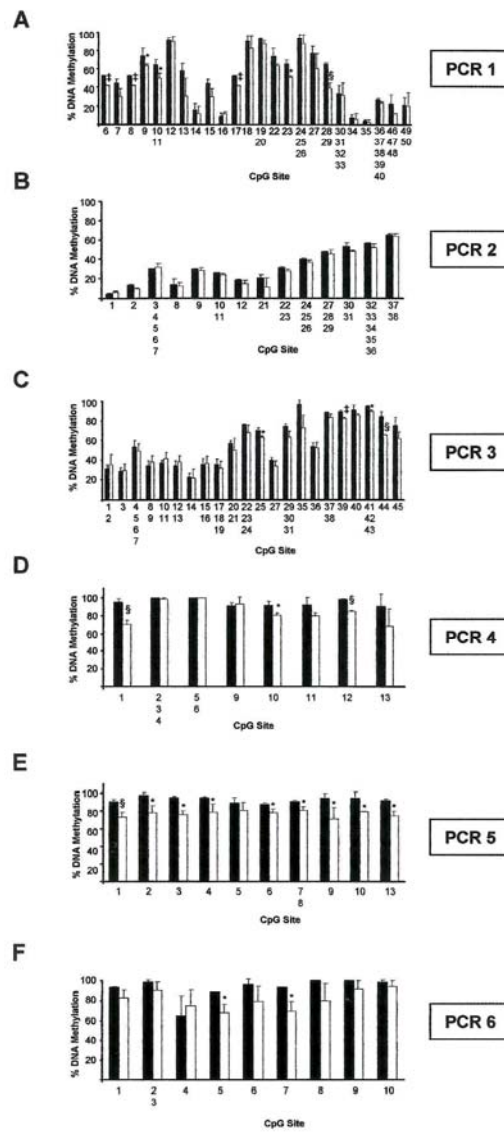
B



PCR 4

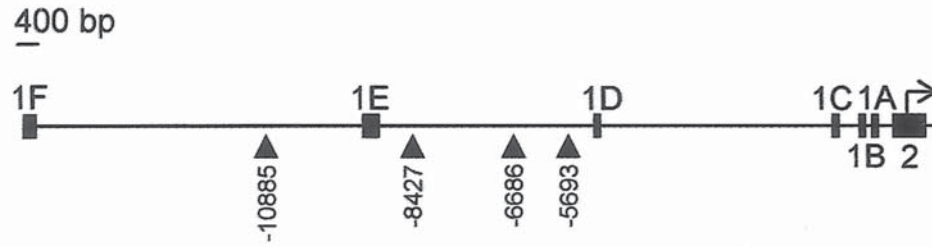
98x136mm (600 x 600 DPI)

Supporting information S4.



102x219mm (600 x 600 DPI)

Supporting information S5.



85x34mm (600 x 600 DPI)

Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supporting information S6

PCR#	CpG site	is % methylation statistically different (vs control U87)?				HeLa			SH-SY5Y		
		HeLa		SH-SY5Y		criteria#			criteria#		
		control	Aza	control	Aza	1	2	3	1	2	3
1	6	**	ns	***	***	+	+	+	+	+	-
	7	ns	ns	**	ns	+	+	+	+	+	+
	8	**	ns	***	***	+	+	+	+	+	-
	9	*	**	ns	*	-			-		
	10.11	ns	ns	*	ns	+	+	+	+	+	+
	12	ns	ns	ns	ns	-			-		
	13	ns	*	ns	ns	-			+	+	+
	14	**	***	ns	ns	-			-		
	15	ns	ns	**	ns	+	+	+	+	+	+
	16	ns	ns	ns	ns	-			-		
	17	**	ns	***	***	+	+	+	+	+	-
	18	**	ns	**	ns	-			-		
	19.20	**	*	**	*	-			+	+	-
	22	*	**	ns	ns	-			-		
	23	**	*	*	ns	+	+	-	+	+	+
	24.25.26	***	**	***	*	-			-		
	27	***	*	**	ns	+	+	-	-		
	28.29	***	*	***	ns	+	+	-	+	+	+
	30.31.32.33	**	**	**	ns	-			-		
	34	ns	ns	ns	ns	-			-		
35	ns	ns	ns	ns	-			-			
36.37.38.39.40	**	**	**	**	-			+	-		
46.47.48	ns	**	ns	**	-			-			
49.50	ns	ns	ns	ns	-			-			
2	1	***	ns	**	*	+	+	+	-		
	2	***	***	ns	*	+	+	-	+	-	
	3.4.5.6.7	***	***	***	**	+	+		-		
	8	***	***	ns	**	+	+	-	-		
	9	***	***	ns	ns	+	+	-	-		
	10.11	***	***	**	**	+	+	-	+	+	-
	12	***	***	ns	ns	+	+	-	-		
	21	**	*	*	ns	+	+	-	-		
	22.23	ns	*	***	***	+	+	-	-		
	24.25.26	**	**	ns	ns	+	+	-	-		
	27.28.29	***	**	ns	ns	+	+	-	-		
	30.31	***	***	ns	***	+	+	-	-		
	32.33.34.35.36	***	***	*	*	+	+	-	-		
	37.38	***	***	***	***	-			-		
3	1.2	***	**	**	*	+	+	-	-		
	3	***	***	***	***	+	+	-	-		
	4.5.6.7	***	ns	*	*	+	+	+	-		
	8.9	***	***	ns	ns	+	+	-	-		

1											
2											
3		10.11	***	**	*	ns	+	+	-	-	
4		12.13	***	***	ns	ns	+	+	-	-	
5		14	***	ns	ns	ns	+	+	+	-	
6		15.16	***	**	ns	ns	+	+	-	-	
7		17.18.19	***	**	ns	*	-			-	
8		20.21	***	ns	***	**	+	+	+	-	
9		22.23.24	**	*	***	**	-			-	
10		25	***	***	ns	**	+	+	-	+	-
11		27	***	ns	***	***	+	+	+	-	
12		29.30.31	***	***	***	***	+	+	-	+	+
13		35	***	***	*	ns	-			-	
14		36	***	**	**	**	+	+	-	-	
15		37.38	***	ns	ns	ns	+	+	+	+	+
16		39	*	**	ns	**	+	+	-	+	-
17		40	ns	*	*	***	+	-		-	
18		41.42.43	ns	**	ns	*	+	+	-	+	-
19		44	ns	*	ns	ns	+	+	-	+	+
20		45	***	*	**	**	+	+	-	+	+
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27	4	1	***	***	ns	***	+	-		+	-
28		2.3.4	ns	***	ns	ns	+	-		-	
29		5.6	ns	ns	ns	ns	-			-	
30		9	ns	***	ns	ns	+	-		-	
31		10	***	***	ns	***	+	-		+	-
32		11	**	***	ns	**	+	-		-	
33		12	***	***	ns	***	+	-		+	+
34		13	ns	**	ns	ns	+	-		-	
35											
36											
37	5	1	**	***	ns	**	+	-		+	-
38		2	ns	*	*	ns	+	+	-	+	+
39		3	**	***	**	*	+	-		+	+
40		4	ns	*	*	ns	-			+	+
41		5	ns	**	*	ns	+	-		-	
42		6	**	*	**	*	+	+	-	+	+
43		7.8	ns	**	ns	**	+	-		+	-
44		9	***	**	ns	*	+	-		+	-
45		10	ns	**	**	*	+	-		+	+
46		13	*	**	***	**	+	+	-	+	+
47											
48											
49											
50	6	1	ns	**	ns	ns	+	+	-	-	
51		2.3	*	***	ns	ns	+	-		-	
52		4	ns	**	*	ns	+	-		-	
53		5	**	***	ns	*	+	-		+	-
54		6	ns	***	ns	ns	+	-		-	
55		7	*	**	ns	*	+	-		+	+
56		8	ns	***	ns	ns	+	-		-	
57		9	ns	**	ns	ns	+	-		-	
58		10	ns	*	ns	ns	+	+	-	-	
59											
60											

VI. Discussió

VI. Discussió

L'adenosina és particularment important en els teixits excitable gràcies a què redueix l'activitat cel·lular i és una font d'energia (Fredholm et al., 1999). Aquest nucleòsid de purina exerceix la seva funció a través de quatre receptors acoblats a proteïna G que són: A₁, A_{2A}, A_{2B} i A₃. Els receptors d'adenosina A₁ (A₁R) i el receptor d'adenosina A_{2A} (A_{2A}R) són els que centren la present tesi. Les àrees on el receptor A₁R és més abundant són: l'hipocamp, el còrtex cerebral, el nucli talàmic i els ganglis basals (Svenningsson et al., 1997). Per altra banda, el A_{2A}R es va identificar, a partir d'estudis autoradiogràfics en els nuclis putamen, l'accumbens, al tubercle olfactori i al globus pàl·lid (Martinez-Mir et al., 1991). Els estudis amb preparacions de membrana han demostrat la seva presència també en altres estructures com el còrtex frontal, el tàlem i l'hipocamp (Ji et al., 1992; M. Ikeda et al., 1993). La majoria d'estudis amb el receptor A_{2A}R s'han dut a terme en els ganglis basals on és vint vegades més abundant i té un paper diferent que a la resta de regions cerebrals. En el sistema límbic i el neocòrtex, A₁R i A_{2A}R tenen una localització presinàptica i A₁R també postsinàptica, on controlen l'alliberament dels neurotransmissors (Cunha, 2005; Quiroz et al., 2009). En terminals glutamatèrgics hipocampals els receptors A₁R i A₂R colocalitzen i desenvolupen una funció oposada sobre l'alliberament de glutamat (Rebola et al., 2005; Ciruela et al., 2006).

Les malalties neurodegeneratives han estat associades, des de sempre, a la toxicitat produïda pel glutamat. A concentracions fisiològiques, el glutamat intervé en l'aprenentatge i la memòria, però a altes concentracions actua com una neurotoxina promovent la mort cel·lular. S'han descrit alteracions en les vies glutamatèrgiques, principalment en el receptor metabotròpic de glutamat 1 (mGluR1). En malalties com DLBp i PiD hi ha un augment del mGluR1, mentre que en DLBc i AD hi ha una disminució del receptor a mesura que augmenta la patologia β -amiloidea (Dolfo et al., 2004, 2005; Albasanz et al., 2005, 2006). S'ha demostrat que mGluR1 accelera el processament del precursor amiloide (APP) produint la forma no amiloideogènica APPs (Louzada et al., 2001), i per tant, una reducció en el receptor pot afavorir la deposició del β -amiloide.

Els efectes neuroprotectors de l'adenosina són principalment a través del receptor A₁R, que inhibeix l'alliberament de glutamat i la reducció dels seus efectes excitatoris a nivell postsinàptic (Dunwiddie & Masino, 2001). Tanmateix s'ha constatat que l'ús de diferents antagonistes del receptor A_{2A}R o la deleció

VI. Discussió

del gen ADORA2A, resulta en la disminució del dany neuronal en animals adults, tot i que el mecanisme pel qual actua roman desconegut (Cunha et al., 2005).

Un increment en el nivell de l'adenosina extracel·lular es pot produir en condicions fisiològiques i patològiques. En situacions d'isquèmia, hipòxia i estrès oxidatiu poden augmentar més de 100 vegades les concentracions normals (Latini et al., 1999; Newby et al., 1991). Un augment d'adenosina pot provocar tant desensibilització com internalització dels receptors d'adenosina per sobreexposició a l'agonista i, al contrari, nivells baixos d'agonista pot produir un augment de l'expressió dels receptors específics (Leon et al., 2002; A. Ruiz et al., 1996, 2005). En les malalties neurodegeneratives com l'AD, els nivells d'adenosina plasmàtica estan disminuïts (Selley, et al., 2004). A més, agents que augmentin l'adenosina extracel·lular han estat considerats complementaris als tractaments amb inhibidors de les acetilcolinesterases, tractament habitual en els malalts d'AD (Ferroni et al., 2002).

Diversos estudis han observat una pèrdua dels receptors A₁R a l'hipocamp i a l'estriat en pacients amb AD (Kalaria et al., 1990; Ulas et al., 1993; M. Ikeda et al., 1993). Malgrat tot, hi ha autors que han suggerit que aquesta pèrdua de receptors no és específica de l'AD, ja que la mateixa pèrdua s'observa en patologies com l'esclerosi (Deckert et al., 1996). Estudis recents del nostre grup amb col·laboradors, no han reproduït aquestes dades sinó al contrari, s'han observat increments del receptor A₁R i d'altres receptors d'adenosina a: malaltia de Pick (PiD), a la malaltia de Creutzfeldt-jakob (CJD) i a la malaltia d'Alzheimer (AD) en diferents regions cerebrals. La raó d'aquestes diferències pot venir per la metodologia emprada però sobretot si s'ha treballat amb extractes d'homogenat total o extractes de membrana.

A la malaltia PiD, una taupatia pura de tipus 3R, s'ha observat un augment d'A₁ i mGluR1 al cortex frontal (CF) tant a nivell de proteïna com d'ARNm. Tanmateix s'han trobat augmentats els receptor A_{2A}R i A_{2B}R, així com la via de transducció de senyals (Albasanz et al., 2006, 2007; Dalfo et al., 2005).

També s'han descrit increments en la malaltia de CJD i altres prionopaties, en els receptors A₁R al CF acompanyats per la sensibilització de la via de senyalització glutamatèrgica de mGluR1 (*mGluR1/PLCbeta1/PKCdelta*) (Rodriguez et al., 2005, 2006).

En el cas d'AD, s'ha observat un lleuger augment d'expressió del receptor A₁R en l'hipocamp en un estadiatge molt avançat sense correspondència en els

nivells d'ARNm. El fet més destacat, però, és la redistribució del receptor cap a les neurones amb cabdells neurofibril·lars i en neurites distròfiques al voltant de les plaques senils de l'hipocamp. No s'observen canvis en la distribució del receptor mGluR1, que es manté localitzat en les cèl·lules piramidals a l'hipocamp i al CF (Angulo et al., 2003). Tanmateix, el receptor A_{2A}R apareix localitzat en la microglia de l'hipocamp dels pacients d'AD. Aquests resultats s'han completat amb el **Treball 1.2** de la present tesi, on s'observa un augment dels receptors A₁R i A_{2A}R ja en estadis preclínics del CF de malalts d'AD. L'intent a nivell farmacològic d'estimular l'efecte protector del receptor A₁R i reduir l'efecte més tòxic del receptor A_{2A}R pot ser un complement en la teràpia contra les malalties neurodegeneratives. D'acord amb aquests resultats, un increment significatiu en els nivells dels receptors A₁R corticals i dels A_{2A}R hipocampals s'ha trobat en els ratolins transgènics d'APP amb la mutació suïssa (Arendash et al., 2006). A més, reforçant el paper del A_{2A}R, la inhibició de la seva activitat permet reduir la formació de pèptid amiloide, tant en ratolins (Dall'Igna et al., 2007; Canas et al., 2009) com en cultius de neurones granulars de rates (Dall'Igna et al., 2003). Els mecanismes de transducció de senyal també estan alterats en aquestes patologies. En AD hi ha una expressió reduïda l'adenilat ciclasa (AC) a l'hipocamp juntament amb un augment de la seva activitat (Yamamoto et al., 2000). En canvi, a PiD hi ha un increment de la AC, fet que la diferencia de l'AD.

Per completar aquest estudi, es van analitzar els nivells d'expressió d'aquests receptors a la malaltia de grans argiròfils (AGD) que s'explica en el **Treball 1.1** de la present tesi. Es va detectar un augment dels nivells d'expressió del receptor A₁R a l'hipocamp de pacients amb la patologia pura, sense canvis en l'expressió dels altres receptors. A més, la seva immunoreactivitat es va trobar localitzada a les neurones sense trobar evidències en els grans. En quant a l'AC, es va trobar augmentada indicant, una sensibilització de la via A₁R/AC en l'hipocamp d'AGD. L'augment de l'expressió de l'AC permet establir diferències entre la patologia d'AD i la d'AGD.

L'activació del receptor A₁R ha estat descrita com un mecanisme que produeix tant disminució de l'activitat neuronal com protecció en front de diferents estímuls (per exemple: neurotoxines, traumes o isquèmies). Els nostres resultats indiquen, doncs, que l'hipocamp és una zona afectada a AGD donat l'increment del receptor A₁R així com, la sensibilització del seu mecanisme transductor de senyals. En el cas de l'AD, l'increment dels receptors A₁R i A_{2A}R

corticals en estadiatges primerencs, suggereix una alteració de la regió cerebral prèvia a l'alteració histopatològica, sent doncs un possible biomarcador d'afectació en estadiatges asimptomàtics i una diana farmacològica.

.....

El receptor d'adenosina $A_{2A}R$ té una funció estriatal diferenciada a la que duur a terme a la resta del cervell (Cunha et al., 2005; Quiroz et al., 2009). Aquests receptors es localitzen selectivament en les neurones gabaèrgiques de la via pal·lidoestriatal. En aquesta regió el receptor $A_{2A}R$ forma complexos heterodimèrics amb els receptors de dopamina 2 (D_2R) antagonitzant la seva activitat (Ferre et al., 1991) mentre que sinergitza amb els receptors metabotròpics de glutamat 5 (mGluR5) (Ferre et al., 2002). S'han descrit canvis en la regió estriatal del receptor $A_{2A}R$ en diferents malalties neurodegeneratives, com per exemple: la malaltia de Parkinson (PD) i la malaltia de Huntington (Varani et al., 2009; Popoli et al., 2002).

A PD hi ha una pèrdua de les neurones dopaminèrgiques que projecten des de la substància negra a l'estriat. Al desaparèixer, hi ha un desequilibri entre les vies directa i indirecta, originant una hiperactivació del nucli STN, que promou trastorns motors com la hipocinèsia, la rigidesa i el tremor. En aquest context, en el **Treball 1.4** es descriu un increment dels receptors $A_{2A}R$ en el nucli estriat de pacients amb PD sense cap tractament farmacològic. Recentment, s'ha descrit un augment dels receptors $A_{2A}R$, sense canvis en els nivells del receptor D_2R en el putamen de pacients amb PD, amb o sense tractament farmacològic (Varani et al., 2009). Tradicionalment el tractament més freqüent pels pacients amb PD ha estat la teràpia de substitució de la dopamina per un agonista, la levodopamina (L-Dopa). Aquest tractament, al cap del temps, produeix l'aparició de discinèsies en resposta a la dosi (LID) (Obeso et al., 2000; Olanow & Obeso, 2000). Sembla que els nivells intermitents de dopamina i la cronicitat del tractament són els responsables d'aquest efecte secundari. S'han descrit increments en l'expressió del receptor $A_{2A}R$ en els pacients que desenvolupen les LID (Calon et al., 2004). Nombrosos estudis amb antagonistes del receptor $A_{2A}R$ han demostrat que la seva administració evita l'aparició de la LID tant en models animals com en pacients (Kanda et al., 1998, 2000; Pinna et al., 2001; Lundblad et al., 2003; Chase et al., 2003; Hauser et al., 2003; Pinna et al., 2007; LeWitt et al., 2008). Aquests estudis confirmen que l'ús d'antagonistes del receptor $A_{2A}R$ o en una teràpia combinada, pot allargar el temps de tractament de la L-Dopa sense efectes secundaris, afavorint a una disminució de

la dosi (LeWitt et al., 2008; Morelli et al., 2007). El mecanisme molecular responsable de la millora del dèficit motor és la relació antagònica dels sistemes dopaminèrgics i adenosinèrgics. Com s'ha descrit anteriorment, els receptors d'adenosina responen a increments d'agonistes i antagonistes modulant el nombre de receptors a la membrana (Leon et al., 2002). A més, s'ha demostrat que el bloqueig dels receptors d'adenosina $A_{2A}R$ redueix la captació de dopamina i redueix la inhibició que el receptor $A_{2A}R$ exerceix sobre el receptor de dopamina de forma directa, alleujant els símptomes motors de la malaltia (Varani et al., 2009; Schwarzschild et al., 2006). Tot i que la majoria d'articles demostren eficiència dels antagonistes del receptor del receptor $A_{2A}R$ en els pacients que desenvolupen LID, els nostres resultats juntament amb els de Varani K, 2009 demostren que l'increment del receptor apareix prèviament al tractament per substitució de dopamina. El mecanisme concret responsable de la desregulació del receptor no es coneix. En el treball de Varani K, 2009 es descriu que els pacients de PD presenten alts nivells de TNF-alfa (una citocina pro-inflamatòria) en sang, mantenint una bona correlació amb la progressió de la malaltia. A partir d'aquestes dades i tenint en compte que TNF-alfa indueix l'expressió d' $A_{2A}R$ en cèl·lules epitelials de pulmó (A549) (Morello et al., 2006), Varani K i col·laboradors, han proposat la hipòtesi de que l'increment de TNF-alfa, induït per un procés inflamatori, és un dels mecanismes responsables de l'increment patològic del receptor $A_{2A}R$. Així doncs, sembla que l'increment del receptor $A_{2A}R$ en pacients amb PD pot tenir una explicació tant en la falta d'innervació dopaminèrgica pròpia de la patologia, per un possible procés inflamatori o per un procés desconegut.

.....

La modulació terapèutica del receptor $A_{2A}R$ no és exclusiva de la PD sinó que s'han vist beneficis en models animals d'epilèpsia, d'isquèmia i de la malaltia de Huntington (P. A. Jones et al., 1998; J. F. Chen et al., 1999; Popoli et al., 2002). Tot i els canvis d'expressió descrits en diferents malalties degeneratives, molt pocs articles s'han centrat en la regulació transcripcional del receptor $A_{2A}R$ (St Hilaire et al., 2009). El **Treball 1.3** de la present tesi, s'ha centrat en conèixer el paper de la metilació de l'ADN en l'expressió del receptor en línies cel·lulars.

La metilació de l'ADN és un dels mecanismes més importants en el silenciament gènic en mamífers i té lloc sobre les citosines que precedeixen a les guanines, coneguts com els dinucleòtids CpG. Aproximadament la meitat dels

VI. Discussió

promotors dels gens humans contenen regions riques en CpG d'entre 500 pb a varies Kbases, conegudes com a illes CpG (CGIs) (A. P. Bird et al., 1986). La majoria estan localitzades en la regió 5'UTR i en el primer exó dels gens (P. A. Jones et al., 1999). De forma general, les regions transcripcionalment actives tenen les CGIs no metilades, mentre que les regions silents estan metilades (Illingworth & Bird, 2009). La metilació de les illes CpG acostuma a estar acompanyada per modificacions de les histones que modulen l'expressió gènica (Lopez-Serra & Esteller, 2008).

El gen ADORA2A codifica pel receptor A_{2A}R i està localitzat en el cromosoma 22 (MacCollin et al., 1994). Aquest gen consisteix en dos exons codificants (exó 2 i 3) separats per un únic intró d'aproximadament 7 Kb. L'exó 1 és un exó no codificant localitzat en l'extrem 5' i presenta sis isoformes específiques de teixit: h1A-h1F (Yu et al., 2004). L'exó humà 1E i el seu homòleg murí, l'exó m1C, comparteixen un 74% de la seqüència homòloga indicant que la regió genòmica està altament preservada. Després d'un anàlisi bioinformàtic d'aproximadament 15 Kbases de la regió 5'UTR del gen humà ADORA2A, es van predir tres CGI (CGI#1, 100bp; CGI#2, 400bp; CGI#3, 1200 Kb). Donat que entre les illes CGI#1 i CGI#2 només hi ha 30pb, es poden considerar una única CGI. A més, aquesta illa CGI#1-2 està localitzada al voltant de l'exó 1E, el qual presenta una alta homologia amb la isoforma murina, suggerint un paper regulador en l'expressió del receptor (Yu et al., 2004).

Per valorar el paper de la metilació de la regió 5'UTR del gen ADORA2A es va utilitzar la plataforma MassArray (Sequenom). Es van analitzar tres línies cel·lulars amb diferents nivells d'expressió del receptor: les HeLa, d'origen epitelial i una baixa expressió del receptor; les SH-SY5Y, que provenen de neuroblastoma i les U87-MG, que provenen de glioblastoma i que tenen una expressió més alta del receptor. El resultat de l'estudi, va mostrar una correlació entre el tant per cent de metilació de les tres línies cel·lulars i els nivells de l'ARNm, és a dir, un major percentatge de metilació en les HeLa, i un menor en les U87-MG i les SH-SY5Y de forma inversament proporcional als nivells l'ARNm basals.

Per comprovar en quin grau la metilació de l'ADN regula l'expressió del receptor, les cèl·lules es van tractar amb agent inhibidor de la metilació, 5'azacytidina (AZA), i un agent metilant com és la S'adenosilmetionina (SAM). L'AZA és un anàleg de la citosina i al llarg de les diferents divisions cel·lulars s'incorpora a l'ADN, provocant una pèrdua de citosines metilades de forma

generalitzada. El tractament amb AZA durant 48h redueix el percentatge de metilació de les HeLa, al voltant d'un 30%; un 15% a les SH-SY5Y i no té cap efecte a les U87-MG. Conjuntament, es va confirmar la pèrdua de metilació amb un assaig d'immunoprecipitació de cromatina contra una proteïna d'unió a grups metil, la MeCP₂ després del tractament amb AZA. En paral·lel, es van analitzar els nivells d'ARNm de les diferents isoformes a les tres línies cel·lulars. L'estudi va confirmar la inducció de la isoforma E en les cèl·lules HeLa i SH-SY5Y, sense observar canvis significatius en les U87-MG. La falta d'efecte del compost en les U87-MG pot estar associat a diferents causes: diferències en els nivells basals de metilació; la dosis emprada i la susceptibilitat de l'AZA en particulars punts del cicle cel·lular, ja que s'ha descrit que només s'incorpora en la fase S de les cèl·lules (Constantinides et al., 1977). En aquesta direcció, la taxa de proliferació de les tres línies cel·lulars és diferent. Les cèl·lules U87-MG proliferen més lentament que les SH-SY5Y i les HeLa, fet que pot justificar perquè tenen diferent resposta a l'AZA en el mateix temps d'exposició.

A nivell de proteïna, l'assaig d'unió a radiolligand no va indicar diferències en la densitat del receptor en membrana en les tres línies cel·lulars estudiades (HeLa: 335±27,6 fmol/mg de proteïna; SH-SY5Y: 259,4±29,0 fmol/mg; U87-MG: 332,6±17,0 fmol/mg) tot i la correlació entre el patró de metilació i els nivells basals de l'ARNm. En canvi, el tractament amb AZA, va promoure un augment del nombre de receptors semblant en les cèl·lules HeLa i SH-SY5Y sense cap efecte en les cèl·lules U87-MG. La falta de correlació entre els nivells basals de l'ARNm i de proteïna pot estar associat a canvis de l'expressió de microRNAs o a canvis en l'estabilitat de l'ARNm en les diferents línies cel·lulars.

S'ha demostrat que canvis en la metilació en CpG individuals afavoreixen o dificulten la interacció amb factors de transcripció i per tant, poden variar l'expressió del gen (Pieper et al., 2008). Ara per ara, no hi ha consens en el percentatge de metilació mínim necessari per promoure la transcripció, i només en un article, s'han analitzat els percentatges de metilació necessaris per seleccionar canvis en els nivells de ARNm. Els autors descriuen entre un 10-50% de pèrdua de metilació de l'ADN en molts gens després del tractament amb AZA en cèl·lules Kasumi-1, suggerint que una petita pèrdua del percentatge de metilació és suficient per promoure un increment en els nivells específics d'ARNm (Flotho et al., 2009).

Com que el tractament amb AZA és inespecífic, es va valorar la possibilitat de que pogués afectar a l'expressió de factors de transcripció relacionats amb el

VI. Discussió

gen *ADORA2A*. En aquest sentit, es va comprovar que ni NFK- β ni B-myb, factors de transcripció relacionats amb *ADORA2A*, modificaven l'expressió del receptor en les cèl·lules HeLa després del tractament amb AZA (St Hilaire et al., 2009). També s'ha descrit que CREB és un activador de l'expressió del gen *ADORA2A* (Chiang et al., 2005), fet que li conferiria un paper regulador en l'expressió del gen després del tractament amb AZA. En aquest sentit, vam observar que les cèl·lules HeLa presentaven basalment nivells elevats de fosfo-CREB. Curiosament, està descrit que fosfo-CREB presenta una menor afinitat pel DNA metilat (Yossifoff et al., 2008). Per tant, aquestes dades suggereixen un possible paper de CREB en el mecanisme d'inducció del receptor $A_{2A}R$ a les cèl·lules HeLa després del tractament desmetilant. Cal tenir en compte, però, que la pèrdua de metilació pot afavorir que els factors de transcripció puguin interaccionar amb més facilitat amb el promotor sense variar els seus nivells d'expressió. Per altra banda, no es pot descartar la implicació d'un factor de transcripció desconegut.

Per completar l'estudi vam tractar les cèl·lules amb el compost 5'S-adenosilmetionina o SAM, un donador de grups metil en les reaccions de transmetilació i que augmenta la metilació en els àcids nucleics, proteïnes, fosfolípids i amines biològiques (Mato et al., 1997). Amb aquests experiments vam arribar a les mateixes conclusions. El tractament amb SAM permet observar una disminució de l'expressió del receptor en les SH-SY5Y i les U87-MG sense observar cap efecte en les cèl·lules HeLa. Al mateix temps, observem com la isoforma E és la disminuïda en el tractament amb SAM a les cèl·lules U87-MG. Paral·lelament, es va confirmar el guany de metilació amb l'assaig d'immunoprecipitació de cromatina de MeCP₂, on s'observa un augment en el grau d'unió a l'ADN després del tractament amb SAM en l'extrem 5'UTR del gen *ADORA2A*. Els tractaments amb SAM sobre les cèl·lules SH-SY5Y i U87-MG demostren la reducció de l'expressió del receptor. En aquest sentit, l'ús de compostos metilants poden ser una alternativa de futur en el tractament de AD i PD (Obeid et al., 2009; Scarpa et al., 2003, 2006). En conclusió, els resultats permeten concloure que el grau de metilació de la regió 5'UTR del gen *ADORA2A* té un paper en la regulació de l'expressió del receptor.

.....

Per tal d'esbrinar si la metilació de l'ADN era un mecanisme molecular implicat en l'increment estriatal d' $A_{2A}R$ vam determinar el perfil de metilació de la regió 5'UTR del gen *ADORA2A* en el nucli estriat mitjançant la plataforma MassARRAY de Sequenom. Aquests resultats es presenten en **el Treball 1.4 dels resultats annexos**. Malauradament, no es van detectar canvis en el percentatge de metilació entre el casos controls i el pacients amb PD en excepció de dos llocs CpG concrets. De totes maneres no es pot descartar una pèrdua de metilació en altres punts de la seqüència que puguin afectar a l'expressió del receptor així com una reducció de l'afinitat de les proteïnes d'unió a grups metil (MBD). A més, recentment s'ha posat de manifest a partir de resultats del nostre propi grup, les limitacions tècniques que comporten aquest tipus d'estudi en teixit postmortem. Treballar amb homogenats totals limita la resolució de la tècnica impedint que s'identifiquin canvis en tipus cel·lulars minoritaris (Barrachina & Ferrer, 2009). A més, no es possible tècnicament mesurar sobre aquest material biològic, canvis en l'afinitat de les MBDs. El que sí podem concloure és que el perfil de metilació de la CGI a regió estriatal és menor al de les línies cel·lulars analitzades. En aquest sentit, està ben establert que les illes CpG no estan metilades en les cèl·lules normals (Weber et al., 2007) mentre que estan hipermetilades a teixits tumorals.

.....

Un altre element a tenir en compte en l'expressió patològica del receptor A_{2A} en pacients amb PD són els factors de transcripció. Mitjançant el programa bioinformàtic MatInspector es van identificar dinou llocs d'unió per ZBP-89 i set per Ying Yang 1 (YY1) en les 15Kbases analitzades de l'extrem 5'UTR del gen *ADORA2A*. Ambdós factors de transcripció són ubiqus i participen en processos de diferenciació, de proliferació, apoptosi i càncer. L'estudi de la implicació d'aquests factors de transcripció en l'expressió del gen *ADORA2A* es presenta en **el Treball 1.4 a l'apartat de Resultats annexos**.

El ZBP-89 (també conegut com BFCOL1, BERF-1 i ZNF-148) és un dit de zenc de tipus Krüppel que es va caracteritzar per primera vegada com a repressor del gen de la gastrina (Merchant et al., 1996). D'expressió ubiqua, interacciona amb elements de l'ADN enriquits en dinucleòtids GC. Actua com a repressor i com activador, en funció del promotor i del context cel·lular (Law et

VI. Discussió

al., 1998; Ye et al., 1999; Wieczorek et al., 2000; Yamada et al., 2001; Bai & Merchant, 2003; Keates et al., 2001; Law et al., 2006; Malo et al., 2006). A més, un important nombre d'estudis associen el ZBP-89 amb tot tipus de funcions. Entre altres, media l'arrest del cicle cel·lular a través de l'activació de p21^(waf1) després de recaptar el coactivador de p300 (Bai & Merchant, 2000). La sobreexpressió de ZBP-89 permet l'arrest del cicle cel·lular i la inducció de l'apoptosi en cultiu i en el teixit intestinal (Taniuchi et al., 1997). Aquesta propietat podria justificar la baixa viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y després de la sobreexpressió de ZBP-89 i la impossibilitat d'analitzar el seu paper regulador sobre el gen *ADORA2A*. En canvi, l'ús d'un siRNA específic per ZBP-89 va revelar el seu paper activador en l'expressió del receptor. Paral·lelament, no es van detectar canvis en els nivells d'expressió ni localització cel·lular de ZBP-89 en el putamen de pacients amb PD respecte els controls. Malgrat aquestes dades, s'ha descrit que ZBP-89 pot ser fosforilat per la cinasa ATM a la Ser202 potenciant la inducció de p21^(Waf1) (Bai & Merchant, 2007). En aquest sentit, cap la possibilitat que ZBP-89 estigui més fosforilat en el putamen de pacients amb PD, però aquesta hipòtesis no s'ha pogut testar ja que no existeix cap anticòs comercial que reconegui la seva forma fosforilada. Per altra banda, aquest factor de transcripció és susceptible a ser sumoitzat. El grup SUMO pot exercir sinèrgia amb ZBP-89 augmentant la seva activitat inhibidora/activadora, allargant la seva vida mitja o participant en l'assemblatge de cossos nuclears (Chupreta et al., 2007; Freiman & Tjian, 2003; Ulrich et al., 2009). Per tant, tot i no augmentar la seva expressió en PD, pot quedar segregat en compartiments nuclears en disposició de la maquinària transcripcional. En resum, els nostres estudis *in vitro* permeten concloure que ZBP-89 participa en l'expressió basal del receptor A_{2A}R amb un paper activador. Per tant, hipotetitzem que aquest és el seu paper regulador en l'expressió cerebral del receptor en individus sans. En quant al seu paper en PD, no podem demostrar cap implicació en la regulació del gen *ADORA2A* donades les dificultats tècniques esmentades a l'hora d'analitzar el material humà postmortem.

En referència al factor de transcripció Yin yang 1 (YY1), presenta una seqüència homòloga a la família Krüppel de dits de zenc i una distribució ubiqua i multifuncional (Shi et al., 1997). S'han descrit gens neuronals que estan regulats per YY1 (He & Casaccia-Bonnel, 2008). El seu paper funcional ha estat associat a processos cel·lulars, com el control del cicle cel·lular, la diferenciació, desenvolupament i apoptosi (Affar el et al., 2006). Cal destacar

que ha estat relacionat amb la patogènesis del PD esporàdic, a través de l'activació de la cinasa dels receptors de proteïna G o GRK5, la qual està associada a la fosforilació de l'alfa-sinucleïna (Arawaka et al., 2006). En els nostres estudis *in vitro*, hem demostrat que YY1 és un repressor del gen *ADORA2A* i en el putamen de malalts de PD, hem observat per immunofluorescència confocal que les neurones A_{2A} positives presenten YY1 nuclear. A més, els nivells d'expressió de YY1 (ARNm i proteïna) estan augmentats en la patologia. Un major estudi serà necessari per dilucidar el mecanisme d'acció de YY1 sobre el gen *ADORA2A*. Serà interessant esbrinar si YY1 interacciona amb el complex HDAC1/2 i MeCP₂ (Nan et al., 1998; M. J. Thomas & Seto, 1999) o si ho fa amb CREB, el qual és un activador de l'expressió *ADORA2A* (Chiang et al., 2005a; Zhou et al., 1995). S'ha descrit que ZBP-89 i YY1 cooperen en diferents processos de diferenciació cel·lular com per exemple durant la miogènesi. En l'augment d'expressió de la citocrom C oxidasa Vb murina el YY1 bloqueja l'activitat de ZBP-89 (Boopathi et al., 2004).

A partir dels nostres anàlisis *in vitro* i els estudis publicats fins ara, l'increment d'expressió de YY1 en el nucli estriat pot ser la resposta a un estímul extern com TNF-alfa, per la pròpia activitat del receptor A_{2A}R o per un mecanisme alternatiu.

Per una banda, en el context de la teoria inflamatòria com a origen de la PD, s'han observat nivells alts de TNF-alfa plasmàtic (Varani et al., 2009) i en el líquid cerebrospinal (Boka et al., 1994) de pacients amb PD, així com un alt nombre de cèl·lules glials positives per TNF-alfa a la substància negra (SNPc) d'aquests pacients (Boka et al., 1994; Mogi et al., 1994). TNF-alfa és una citocina que promou la inflamació però també funcions de protecció de la resposta immunitària, proliferació cel·lular i diferenciació (Pfeffer, 2003). En la línia de que el TNF-alfa pot tenir un paper en la patofisiologia de la PD, s'ha observat que els ratolins deficientes en TNF-alfa protegeixen parcialment contra 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidrofiridina (MPTP) (Ferber et al., 2004). El doble knock-out de TNF-alfa i el seu receptor, suprimeix l'activació de la microglia i protegeix contra la neurotoxicitat de MPTP a les neurones dopaminèrgiques (Sriram et al., 2002, 2006). Finalment, una injecció intra-craneal de TNF-alfa causa pèrdua de neurones dopaminèrgiques en la SNPc de ratolins (Carvey et al., 2005). Curiosament, el TNF-alfa indueix canvis en la regulació transcripcional de molts gens, i un exemple és el gen YY1 (Huerta-Yepez et al., 2006). S'ha descrit que un increment de TNF-alfa produeix un augment de l'expressió de YY1 i NF-KB,

VI. Discussió

repressors de l'expressió de Fas, i per tant, TNF-alfa confereix resistència a l'apoptosi induïda per Fas-L. Cal destacar que ha estat descrit que l'expressió de Fas i Fas-L són mecanismes regulats a la baixa en la PD (Ferrer et al., 2000). Si aquest escenari el traslладem al context de la PD, l'increment dels nivells de YY1 pot ser un mecanisme que contribueix la supervivència cel·lular en resposta a l'increment de TNF-alfa.

Per altra banda, YY1 pot estar regulat per fosfo-CREB (X. Zhang et al., 2005) el qual es fosforila per l'activitat AC, via augmentada al putamen de malalts amb PD (Varani et al., 2009). Per tant, una altra possibilitat és que l'increment dels nivells de YY1 estriatals observats a PD provinguin de la pròpia activitat del receptor $A_{2A}R$ (Fredholm et al., 2005, 2007). Donat que els nostres resultats *in vitro* confereixen al YY1 un paper repressor en el control del gen *ADORA2A*, podem hipotetitzar que YY1 representa un mecanisme de regulació retrògrada del propi receptor així com un mecanisme de supervivència cel·lular. A més, donada l'existència del complex YY1/ZBP-89 com s'ha mencionat anteriorment, no es descarta que l'increment estriatal de YY1 redueixi el paper activador de ZBP-89 sobre l'expressió del receptor $A_{2A}R$.

Finalment, el conjunt de tot aquest estudi permet proposar l'ús d'agents metilants de l'ADN, així com la modulació de YY1, com a eines farmacològiques per reduir els nivells estriatals d' $A_{2A}R$ a PD i d'aquesta manera minvar les discinèsies característiques d'aquesta patologia i allargar els tractaments farmacològics amb L-Dopa i reduir la dosi terapèutica.

VII. Conclusions

VII. Conclusions

1. *Els nivells d'expressió hipocampals del receptor d'adenosina A₁ i de l'adenilat ciclasa estan incrementats en la malaltia de grans argiròfils.*
2. *El receptor adenosina A_{2A} (A_{2A}R) està incrementat en el putamen postmortem de pacients amb la malaltia de Parkinson sense tractament farmacològic.*
3. *La metilació de l'ADN regula l'expressió del gen ADORA2A.*
4. *Un tractament amb agents metilants de l'ADN pot ser una estratègia farmacològica per reduir l'activitat del receptor d'adenosina A_{2A}R.*
5. *El factor de transcripció del ZBP-89 és un activador de l'expressió del gen ADORA2A.*
6. *Els nivells d'expressió del ZBP-89 no estan alterats en el putamen de pacients amb la malaltia de Parkinson sense tractament farmacològic.*
7. *El factor de transcripció YY1 és un repressor de l'expressió del gen ADORA2A.*
8. *Els nivells d'expressió del YY1 estan incrementats a nivell d'ARNm en el putamen de pacients amb la malaltia de Parkinson sense tractament farmacològic.*
9. *Les neurones estriatals A_{2A}R positives colocalitzen amb YY1 nuclear.*

VIII. Bibliografia

VIII. Bibliografia

- Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., Liu, H., Huarte, M., Wu, S., et al. (2006). Essential dosage-dependent functions of the transcription factor yin yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*, 26(9), 3565-3581. doi:10.1128/MCB.26.9.3565-3581.2006
- Agnati, L. F., & Fuxe, K. (1980). On the mechanism of the antiparkinsonian action of 1-DOPA and bromocriptine: A theoretical and experimental analysis of dopamine receptor sub- and supersensitivity. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (16)(16), 69-81.
- Ahmad, K., & Henikoff, S. (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 Suppl 4, 16477-16484. doi:10.1073/pnas.172403699
- Albasanz, J. L., Dalfo, E., Ferrer, I., & Martin, M. (2005). Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in alzheimer's disease and dementia with lewy bodies correlates with stage of alzheimer's-disease-related changes. *Neurobiology of Disease*, 20(3), 685-693. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.001
- Albasanz, J. L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I., & Martin, M. (2008). Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(2), 211-219. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x (FORA Manualment)
- Albasanz, J. L., Rodriguez, A., Ferrer, I., & Martin, M. (2006). Adenosine A2A receptors are up-regulated in pick's disease frontal cortex. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 16(4), 249-255. doi:10.1111/j.1750-3639.2006.00026.x
- Albasanz, J. L., Rodriguez, A., Ferrer, I., & Martin, M. (2007). Up-regulation of adenosine A1 receptors in frontal cortex from pick's disease cases. *The European Journal of Neuroscience*, 26(12), 3501-3508. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05965.x
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23(2), 185-188. doi:10.1038/13810
- Andreadis, A., Broderick, J. A., & Kosik, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Research*, 23(17), 3585-3593.
- Angulo, E., Casado, V., Mallol, J., Canela, E. I., Vinals, F., Ferrer, I., et al. (2003). A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in alzheimer disease and mediate both amyloid precursor

VIII. Bibliografia

- protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 13(4), 440-451.
- Anne-Laurence, B., Caroline, R., Irina, P., & Jean-Philippe, L. (2007). Chromatin acetylation status in the manifestation of neurodegenerative diseases: HDAC inhibitors as therapeutic tools. *Sub-Cellular Biochemistry*, 41, 263-293.
- Aoyama, S., Kase, H., & Borrelli, E. (2000). Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(15), 5848-5852.
- Arawaka, S., Wada, M., Goto, S., Karube, H., Sakamoto, M., Ren, C. H., et al. (2006). The role of G-protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(36), 9227-9238. doi:10.1523/JNEUROSCI.0341-06.2006
- Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., et al. (2006). Caffeine protects alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain beta-amyloid production. *Neuroscience*, 142(4), 941-952. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.07.021
- Armstrong, R. A., Lantos, P. L., & Cairns, N. J. (2008). What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease? *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 28(4), 351-365. doi:10.1111/j.1440-1789.2008.00916.x
- Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N., & Atchison, M. L. (2003). Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *The EMBO Journal*, 22(6), 1347-1358. doi:10.1093/emboj/cdg124
- Bai, L., Kao, J. Y., Law, D. J., & Merchant, J. L. (2006). Recruitment of ataxia-telangiectasia mutated to the p21(waf1) promoter by ZBP-89 plays a role in mucosal protection. *Gastroenterology*, 131(3), 841-852. doi:10.1053/j.gastro.2006.06.014
- Bai, L., & Merchant, J. L. (2000). Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30725-30733. doi:10.1074/jbc.M004249200
- Bai, L., & Merchant, J. L. (2003). Transcription factor ZBP-89 is required for STAT1 constitutive expression. *Nucleic Acids Research*, 31(24), 7264-7270.
- Bai, L., & Merchant, J. L. (2007). ATM phosphorylates ZBP-89 at Ser202 to potentiate p21waf1 induction by butyrate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(3), 817-821. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.197

- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E., & Young, J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 447(5), 735-743. doi:10.1007/s00424-003-1103-2
- Ballatore, C., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews.Neuroscience*, 8(9), 663-672. doi:10.1038/nrn2194
- Ballestar, E., & Wolffe, A. P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. targeting specific gene repression. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(1), 1-6.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., et al. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120-124. doi:10.1038/35065138
- Bara-Jimenez, W., Sherzai, A., Dimitrova, T., Favit, A., Bibbiani, F., Gillespie, M., et al. (2003). Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of parkinson's disease. *Neurology*, 61(3), 293-296.
- Barbot, W., Dupressoir, A., Lazar, V., & Heidmann, T. (2002). Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: Progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Research*, 30(11), 2365-2373.
- Barrachina, M., & Ferrer, I. (2009). DNA methylation of alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(8), 880-891. doi:10.1097/NEN.0b013e3181af2e46
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., et al. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009
- Baunack, E., Falk, U., & Gartner, K. (1984). Monozygotic vs. dizygotic twin behavior in artificial mouse twins. *Genetics*, 106(3), 463-477.
- Becker, P. B., & Horz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 247-273. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135400
- Bestor, T. H., & Tycko, B. (1996). Creation of genomic methylation patterns. *Nature Genetics*, 12(4), 363-367. doi:10.1038/ng0496-363
- Birchler, J. A., Bhadra, M. P., & Bhadra, U. (2000). Making noise about silence: Repression of repeated genes in animals. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(2), 211-216.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6-21. doi:10.1101/gad.947102

VIII. Bibliografia

- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143), 396-398. doi:10.1038/nature05913
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209-213. doi:10.1038/321209a0
- Blount, B. C., Mack, M. M., Wehr, C. M., MacGregor, J. T., Hiatt, R. A., Wang, G., et al. (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3290-3295.
- Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., & Hirsch, E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 172(1-2), 151-154.
- Boopathi, E., Lenka, N., Prabu, S. K., Fang, J. K., Wilkinson, F., Atchison, M., et al. (2004). Regulation of murine cytochrome c oxidase vb gene expression during myogenesis: YY-1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BERF-1/ZBP-89 factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35242-35254. doi:10.1074/jbc.M403160200
- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Medicine*, 10 Suppl, S2-9. doi:10.1038/nm1067
- Braak, H., & Braak, E. (1987). Argyrophilic grains: Characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without alzheimer changes. *Neuroscience Letters*, 76(1), 124-127.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of parkinson's disease-related pathology. *Cell and Tissue Research*, 318(1), 121-134. doi:10.1007/s00441-004-0956-9
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. M. (2007). Forecasting the global burden of alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 3(3), 186-191. doi:10.1016/j.jalz.2007.04.381
- Calon, F., Dridi, M., Hornykiewicz, O., Bedard, P. J., Rajput, A. H., & Di Paolo, T. (2004). Increased adenosine A2A receptors in the brain of parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain : A Journal of Neurology*, 127(Pt 5), 1075-1084. doi:10.1093/brain/awh128
- Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., de Benedetti, P., Goldberg, S. R., et al. (2003). Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46741-46749. doi:10.1074/jbc.M306451200

- Canas, P. M., Porciuncula, L. O., Cunha, G. M., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M., et al. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(47), 14741-14751. doi:10.1523/JNEUROSCI.3728-09.2009
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., et al. (2007). Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249-2259. doi:10.1038/sj.npp.1301375
- Carvey, P. M., Chen, E. Y., Lipton, J. W., Tong, C. W., Chang, Q. A., & Ling, Z. D. (2005). Intra-parenchymal injection of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta produces dopamine neuron loss in the rat. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(5), 601-612. doi:10.1007/s00702-004-0222-z
- Castillo, C. A., Albasanz, J. L., Leon, D., Jordan, J., Pallas, M., Camins, A., et al. (2009). Age-related expression of adenosine receptors in brain from the senescence-accelerated mouse. *Experimental Gerontology*, 44(6-7), 453-461. doi:10.1016/j.exger.2009.04.006
- Chahrour, M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T., Qin, J., et al. (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5880), 1224-1229. doi:10.1126/science.1153252
- Chase, T. N., Bibbiani, F., Bara-Jimenez, W., Dimitrova, T., & Oh-Lee, J. D. (2003). Translating A2A antagonist KW6002 from animal models to parkinsonian patients. *Neurology*, 61(11 Suppl 6), S107-11.
- Chen, G. G., Merchant, J. L., Lai, P. B., Ho, R. L., Hu, X., Okada, M., et al. (2003). Mutation of p53 in recurrent hepatocellular carcinoma and its association with the expression of ZBP-89. *The American Journal of Pathology*, 162(6), 1823-1829.
- Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., et al. (1999). A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), 9192-9200.
- Cheng, J. T., Liu, I. M., Juang, S. W., & Jou, S. B. (2000). Decrease of adenosine A-1 receptor gene expression in cerebral cortex of aged rats. *Neuroscience Letters*, 283(3), 227-229.
- Chiang, M. C., Lee, Y. C., Huang, C. L., & Chern, Y. (2005). cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant huntingtin with expanded polyglutamine residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14331-14340. doi:10.1074/jbc.M413279200

VIII. Bibliografia

- Chu, Y. Y., Tu, K. H., Lee, Y. C., Kuo, Z. J., Lai, H. L., & Chern, Y. (1996). Characterization of the rat A2a adenosine receptor gene. *DNA and Cell Biology*, 15(4), 329-337.
- Chupreta, S., Brevig, H., Bai, L., Merchant, J. L., & Iniguez-Lluhi, J. A. (2007). Sumoylation-dependent control of homotypic and heterotypic synergy by the kruppel-type zinc finger protein ZBP-89. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36155-36166. doi:10.1074/jbc.M708130200
- Ciruela, F., Casado, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., & Franco, R. (1995). Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 42(6), 818-828. doi:10.1002/jnr.490420610
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M. M., et al. (2001). Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18345-18351. doi:10.1074/jbc.M006960200
- Ciruela, F., Ferre, S., Casado, V., Cortes, A., Cunha, R. A., Lluís, C., et al. (2006). Heterodimeric adenosine receptors: A device to regulate neurotransmitter release. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 63(21), 2427-2431. doi:10.1007/s00018-006-6216-2
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*, 11(7), 909-913. doi:10.1038/ncb1901
- Constantinides, P. G., Jones, P. A., & Gevers, W. (1977). Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature*, 267(5609), 364-366.
- Coppede, F., Mancuso, M., Siciliano, G., Migliore, L., & Murri, L. (2006). Genes and the environment in neurodegeneration. *Bioscience Reports*, 26(5), 341-367. doi:10.1007/s10540-006-9028-6
- Corsi, C., Melani, A., Bianchi, L., & Pedata, F. (2000). Striatal A2A adenosine receptor antagonism differentially modifies striatal glutamate outflow in vivo in young and aged rats. *Neuroreport*, 11(11), 2591-2595.
- Cremer, T., & Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature Reviews Genetics*, 2(4), 292-301. doi:10.1038/35066075
- Cunha, R. A. (2001). Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International*, 38(2), 107-125.
- Cunha, R. A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signalling*, 1(2), 111-134. doi:10.1007/s11302-005-0649-1

- Dalfo, E., Albasanz, J. L., Martin, M., & Ferrer, I. (2004). Abnormal metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the cerebral cortex in diffuse lewy body disease is associated with irregular alpha-synuclein/phospholipase C (PLCbeta1) interactions. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *14*(4), 388-398.
- Dalfo, E., Albasanz, J. L., Rodriguez, A., Martin, M., & Ferrer, I. (2005). Abnormal group I metabotropic glutamate receptor expression and signaling in the frontal cortex in pick disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *64*(7), 638-647.
- Dalfo, E., Barrachina, M., Rosa, J. L., Ambrosio, S., & Ferrer, I. (2004). Abnormal alpha-synuclein interactions with rab3a and rabphilin in diffuse lewy body disease. *Neurobiology of Disease*, *16*(1), 92-97. doi:10.1016/j.nbd.2004.01.001
- Dalfo, E., & Ferrer, I. (2005). Alpha-synuclein binding to rab3a in multiple system atrophy. *Neuroscience Letters*, *380*(1-2), 170-175. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.034
- Dall'Igna, O. P., Fett, P., Gomes, M. W., Souza, D. O., Cunha, R. A., & Lara, D. R. (2007). Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Experimental Neurology*, *203*(1), 241-245. doi:10.1016/j.expneurol.2006.08.008
- Dall'Igna, O. P., Porciuncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., & Lara, D. R. (2003). Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology*, *138*(7), 1207-1209. doi:10.1038/sj.bjp.0705185
- De Cesare, D., Fimia, G. M., & Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: Plasticity in transcriptional activation. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(7), 281-285.
- Deckert, J., Nothen, M. M., Rietschel, M., Wildenauer, D., Bondy, B., Ertl, M. A., et al. (1996). Human adenosine A2a receptor (A2aAR) gene: Systematic mutation screening in patients with schizophrenia. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *103*(12), 1447-1455.
- D'Esposito, M., Quaderi, N. A., Ciccodicola, A., Bruni, P., Esposito, T., D'Urso, M., et al. (1996). Isolation, physical mapping, and northern analysis of the X-linked human gene encoding methyl CpG-binding protein, MECP2. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, *7*(7), 533-535.
- Dinger, M. E., Baillie, G. J., & Musgrave, D. R. (2000). Growth phase-dependent expression and degradation of histones in the thermophilic archaeon thermococcus zilligii. *Molecular Microbiology*, *36*(4), 876-885.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5866), 1086-1089. doi:10.1126/science.1152993

VIII. Bibliografia

- Dizik, M., Christman, J. K., & Wainfan, E. (1991). Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis*, *12*(7), 1307-1312.
- Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *15*(1), 3-16. doi:10.1016/j.semcd.2003.12.008
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., et al. (1999). Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(8), 5504-5511.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., & Richmond, T. J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5701), 1571-1573. doi:10.1126/science.1103124
- Dunwiddie, T. V., & Masino, S. A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, *24*, 31-55. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.31
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., et al. (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nature Genetics*, *38*(12), 1378-1385. doi:10.1038/ng1909
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, *429*(6990), 457-463. doi:10.1038/nature02625
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., et al. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Research*, *10*(8), 2709-2721.
- Espada, J., & Esteller, M. (2007). Epigenetic control of nuclear architecture. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *64*(4), 449-457. doi:10.1007/s00018-007-6358-x
- Falls, J. G., Pulford, D. J., Wylie, A. A., & Jirtle, R. L. (1999). Genomic imprinting: Implications for human disease. *The American Journal of Pathology*, *154*(3), 635-647.
- Feo, S., Antona, V., Cammarata, G., Cavaleri, F., Passantino, R., Rubino, P., et al. (2001). Conserved structure and promoter sequence similarity in the mouse and human genes encoding the zinc finger factor BERF-1/BFCOL1/ZBP-89. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *283*(1), 209-218. doi:10.1006/bbrc.2001.4753
- Ferger, B., Leng, A., Mura, A., Hengerer, B., & Feldon, J. (2004). Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *Journal of Neurochemistry*, *89*(4), 822-833. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02399.x

- Ferre, S., Borycz, J., Goldberg, S. R., Hope, B. T., Morales, M., Lluís, C., et al. (2005). Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses. *Journal of Integrative Neuroscience*, 4(4), 445-464.
- Ferre, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M. A., et al. (2002). Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: Implications for striatal neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11940-11945. doi:10.1073/pnas.172393799
- Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., & Fuxe, K. (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7238-7241.
- Ferrer, I., Barrachina, M., & Puig, B. (2002). Anti-tau phospho-specific Ser262 antibody recognizes a variety of abnormal hyper-phosphorylated tau deposits in tauopathies including pick bodies and argyrophilic grains. *Acta Neuropathologica*, 104(6), 658-664. doi:10.1007/s00401-002-0600-2
- Ferrer, I., Barrachina, M., Tolnay, M., Rey, M. J., Vidal, N., Carmona, M., et al. (2003). Phosphorylated protein kinases associated with neuronal and glial tau deposits in argyrophilic grain disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 13(1), 62-78.
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., & Puig, B. (2001)a. Phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK-P), protein kinase of 38 kDa (p38-P), stress-activated protein kinase (SAPK/JNK-P), and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaM kinase II) are differentially expressed in tau deposits in neurons and glial cells in tauopathies. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 108(12), 1397-1415. doi:10.1007/s007020100016
- Ferrer, I., Blanco, R., Carmona, M., Ribera, R., Goutan, E., Puig, B., et al. (2001)b. Phosphorylated map kinase (ERK1, ERK2) expression is associated with early tau deposition in neurones and glial cells, but not with increased nuclear DNA vulnerability and cell death, in alzheimer disease, pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(2), 144-158.
- Ferrer, I., Blanco, R., Cutillas, B., & Ambrosio, S. (2000). Fas and fas-L expression in huntington's disease and parkinson's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 26(5), 424-433.
- Ferrer, I., Santpere, G., & van Leeuwen, F. W. (2008). Argyrophilic grain disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 131(Pt 6), 1416-1432. doi:10.1093/brain/awm305
- Ferroni, S., Marchini, C., Ogata, T., & Schubert, P. (2002). Recovery of deficient cholinergic calcium signaling by adenosine in cultured rat

VIII. Bibliografia

- cortical astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 68(5), 615-621. doi:10.1002/jnr.10248
- Fischer, D. F., De Vos, R. A., Van Dijk, R., De Vrij, F. M., Proper, E. A., Sonnemans, M. A., et al. (2003). Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(14), 2014-2024. doi:10.1096/fj.03-0205com
- Fletcher, T. M., & Hansen, J. C. (1995). Core histone tail domains mediate oligonucleosome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25359-25362.
- Flotho, C., Claus, R., Batz, C., Schneider, M., Sandrock, I., Ihde, S., et al. (2009). The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 23(6), 1019-1028. doi:10.1038/leu.2008.397
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), 10604-10609. doi:10.1073/pnas.0500398102
- Fredholm, B. B., Battig, K., Holmen, J., Nehlig, A., & Zwartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 83-133.
- Fredholm, B. B., Chen, J. F., Cunha, R. A., Svenningsson, P., & Vaugeois, J. M. (2005). Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology*, 63, 191-270. doi:10.1016/S0074-7742(05)63007-3
- Fredholm, B. B., Chern, Y., Franco, R., & Sitkovsky, M. (2007). Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 263-276. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.07.005
- Freiman, R. N., & Tjian, R. (2003). Regulating the regulators: Lysine modifications make their mark. *Cell*, 112(1), 11-17.
- Fujino, Y., Delucia, M. W., Davies, P., & Dickson, D. W. (2004). Ballooned neurones in the limbic lobe are associated with alzheimer type pathology and lack diagnostic specificity. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(6), 676-682. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00593.x
- Fujishiro, H., Uchikado, H., Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yokota, O., et al. (2009). Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathologica*, 117(2), 151-158. doi:10.1007/s00401-008-0463-2

- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261-282.
- Gartner, K. (1990). A third component causing random variability beside environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year long effort to standardize laboratory animals? *Laboratory Animals*, 24(1), 71-77.
- Ghebremedhin, E., Schultz, C., Botez, G., Rub, U., Sassin, I., Braak, E., et al. (1998). Argyrophilic grain disease is associated with apolipoprotein E epsilon 2 allele. *Acta Neuropathologica*, 96(3), 222-224.
- Gines, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casado, V., Canela, E. I., et al. (2000). Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15), 8606-8611. doi:10.1073/pnas.150241097
- Goker-Alpan, O., Lopez, G., Vithayathil, J., Davis, J., Hallett, M., & Sidransky, E. (2008). The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Archives of Neurology*, 65(10), 1353-1357. doi:10.1001/archneur.65.10.1353
- Gordon, S., Akopyan, G., Garban, H., & Bonavida, B. (2006). Transcription factor YY1: Structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, 25(8), 1125-1142. doi:10.1038/sj.onc.1209080
- Gosal, D., Ross, O. A., & Toft, M. (2006). Parkinson's disease: The genetics of a heterogeneous disorder. *European Journal of Neurology : The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 13(6), 616-627. doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01336.x
- Greene, R. W., & Haas, H. L. (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 36(4), 329-341.
- Grinberg, L. T., Rueb, U., Alho, A. T., & Heinsen, H. (2009). Brainstem pathology and non-motor symptoms in PD. *Journal of the Neurological Sciences*, doi:10.1016/j.jns.2009.08.021
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913-4917.
- Guo, B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (1997). ATF1 and CREB trans-activate a cell cycle regulated histone H4 gene at a distal nuclear matrix associated promoter element. *Biochemistry*, 36(47), 14447-14455. doi:10.1021/bi971781s

VIII. Bibliografia

- Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., & Bird, A. (2007). Reversal of neurological defects in a mouse model of rett syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5815), 1143-1147. doi:10.1126/science.1138389
- Hall, I. M., Shankaranarayana, G. D., Noma, K., Ayoub, N., Cohen, A., & Grewal, S. I. (2002). Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2232-2237. doi:10.1126/science.1076466
- Hauser, R. A., Hubble, J. P., Truong, D. D., & Istradefylline US-001 Study Group. (2003). Randomized trial of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline in advanced PD. *Neurology*, 61(3), 297-303.
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2009). Parkinson's disease: The dual hit theory revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 615-622. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04365.x
- He, Y., & Casaccia-Bonnel, P. (2008). The yin and yang of YY1 in the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1493-1502. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05486.x
- Hendrich, B., & Bird, A. (2000). Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: Proteins involved in DNA methylation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249, 55-74.
- Hernandez, D. G., Paisan-Ruiz, C., McInerney-Leo, A., Jain, S., Meyer-Lindenberg, A., Evans, E. W., et al. (2005). Clinical and positron emission tomography of parkinson's disease caused by LRRK2. *Annals of Neurology*, 57(3), 453-456. doi:10.1002/ana.20401
- Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., et al. (2002). Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18091-18097. doi:10.1074/jbc.M107731200
- Huerta-Yepez, S., Vega, M., Garban, H., & Bonavida, B. (2006). Involvement of the TNF-alpha autocrine-paracrine loop, via NF-kappaB and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to fas-induced apoptosis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 120(3), 297-309. doi:10.1016/j.clim.2006.03.015
- Ikeda, K., Akiyama, H., Arai, T., Matsushita, M., Tsuchiya, K., & Miyazaki, H. (2000). Clinical aspects of argyrophilic grain disease. *Clinical Neuropathology*, 19(6), 278-284.
- Ikeda, M., Mackay, K. B., Dewar, D., & McCulloch, J. (1993). Differential alterations in adenosine A1 and kappa 1 opioid receptors in the striatum in alzheimer's disease. *Brain Research*, 616(1-2), 211-217.
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Letters*, 583(11), 1713-1720. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.012

- Isogai, Y., & Tjian, R. (2003). Targeting genes and transcription factors to segregated nuclear compartments. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(3), 296-303.
- Issa, J. P. (2000). CpG-island methylation in aging and cancer. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 249, 101-118.
- Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., & Baylin, S. B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature Genetics*, 7(4), 536-540. doi:10.1038/ng0894-536
- Jacob, R. A. (1999). The role of micronutrients in DNA synthesis and maintenance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 472, 101-113.
- Jao, C. C., Der-Sarkissian, A., Chen, J., & Langen, R. (2004). Structure of membrane-bound alpha-synuclein studied by site-directed spin labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8331-8336. doi:10.1073/pnas.0400553101
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074-1080. doi:10.1126/science.1063127
- Ji, X. D., Stiles, G. L., van Galen, P. J., & Jacobson, K. A. (1992). Characterization of human striatal A2-adenosine receptors using radioligand binding and photoaffinity labeling. *Journal of Receptor Research*, 12(2), 149-169.
- Jones, P. A. (1999). The DNA methylation paradox. *Trends in Genetics : TIG*, 15(1), 34-37.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews.Genetics*, 3(6), 415-428. doi:10.1038/nrg816
- Jones, P. A., Smith, R. A., & Stone, T. W. (1998). Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A2A receptor antagonist. *Brain Research*, 800(2), 328-335.
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., et al. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187-191. doi:10.1038/561
- Jorgensen, H. F., & Bird, A. (2002). MeCP2 and other methyl-CpG binding proteins. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(2), 87-93. doi:10.1002/mrdd.10021
- Kalaria, R. N., Sromek, S., Wilcox, B. J., & Unnerstall, J. R. (1990). Hippocampal adenosine A1 receptors are decreased in alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 118(2), 257-260.

VIII. Bibliografia

- Kaludov, N. K., & Wolffe, A. P. (2000). MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: Selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Research*, 28(9), 1921-1928.
- Kanda, T., Jackson, M. J., Smith, L. A., Pearce, R. K., Nakamura, J., Kase, H., et al. (1998). Adenosine A2A antagonist: A novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in parkinsonian monkeys. *Annals of Neurology*, 43(4), 507-513. doi:10.1002/ana.410430415
- Kanda, T., Jackson, M. J., Smith, L. A., Pearce, R. K., Nakamura, J., Kase, H., et al. (2000). Combined use of the adenosine A(2A) antagonist KW-6002 with L-DOPA or with selective D1 or D2 dopamine agonists increases antiparkinsonian activity but not dyskinesia in MPTP-treated monkeys. *Experimental Neurology*, 162(2), 321-327. doi:10.1006/exnr.2000.7350
- Keates, A. C., Keates, S., Kwon, J. H., Arseneau, K. O., Law, D. J., Bai, L., et al. (2001). ZBP-89, Sp1, and nuclear factor-kappa B regulate epithelial neutrophil-activating peptide-78 gene expression in caco-2 human colonic epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43713-43722. doi:10.1074/jbc.M107838200
- Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J., & Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell*, 44(4), 535-543.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608. doi:10.1038/33416
- Kontopoulos, E., Parvin, J. D., & Feany, M. B. (2006). Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 15(20), 3012-3023. doi:10.1093/hmg/ddl243
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 184(139), 868-871.
- Kosik, K. S., Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. (1986). Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), 4044-4048.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), 198-209.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Kovacs, G. G., Pittman, A., Revesz, T., Luk, C., Lees, A., Kiss, E., et al. (2008). MAPT S305I mutation: Implications for argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathologica*, 116(1), 103-118. doi:10.1007/s00401-007-0322-6

- Kreth, S., Ledderose, C., Kaufmann, I., Groeger, G., & Thiel, M. (2008). Differential expression of 5'-UTR splice variants of the adenosine A2A receptor gene in human granulocytes: Identification, characterization, and functional impact on activation. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(9), 3276-3286. doi:10.1096/fj.07-101097
- Kriaucionis, S., & Bird, A. (2003). DNA methylation and rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, 12 Spec No 2, R221-7. doi:10.1093/hmg/ddg286
- Kriaucionis, S., & Bird, A. (2004). The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1818-1823. doi:10.1093/nar/gkh349
- Kuusisto, E., Salminen, A., & Alafuzoff, I. (2002). Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in alzheimer's disease: Possible role in tangle formation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 28(3), 228-237.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979-980.
- Latini, S., Bordoni, F., Pedata, F., & Corradetti, R. (1999). Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, 127(3), 729-739. doi:10.1038/sj.bjp.0702591
- Latini, S., & Pedata, F. (2001). Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *Journal of Neurochemistry*, 79(3), 463-484.
- Law, D. J., Labut, E. M., Adams, R. D., & Merchant, J. L. (2006). An isoform of ZBP-89 predisposes the colon to colitis. *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1342-1350. doi:10.1093/nar/gkl022
- Law, D. J., Tarle, S. A., & Merchant, J. L. (1998). The human ZBP-89 homolog, located at chromosome 3q21, represses gastrin gene expression. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 9(2), 165-167.
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *Lancet*, 373(9680), 2055-2066. doi:10.1016/S0140-6736(09)60492-X
- Leon, D., Albasanz, J. L., Ruiz, M. A., Fernandez, M., & Martin, M. (2002). Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. *Journal of Neurochemistry*, 82(3), 625-634.
- LeWitt, P. A., Guttman, M., Tetrud, J. W., Tuite, P. J., Mori, A., Chaikin, P., et al. (2008). Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in parkinson's disease: A double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Annals of Neurology*, 63(3), 295-302. doi:10.1002/ana.21315

VIII. Bibliografia

- Lin, J. C., Jeong, S., Liang, G., Takai, D., Fatemi, M., Tsai, Y. C., et al. (2007). Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell*, 12(5), 432-444. doi:10.1016/j.ccr.2007.10.014
- Lopez-Serra, L., & Esteller, M. (2008). Proteins that bind methylated DNA and human cancer: Reading the wrong words. *British Journal of Cancer*, 98(12), 1881-1885. doi:10.1038/sj.bjc.6604374
- Louzada, P. R., Jr, Paula Lima, A. C., de Mello, F. G., & Ferreira, S. T. (2001). Dual role of glutamatergic neurotransmission on amyloid beta(1-42) aggregation and neurotoxicity in embryonic avian retina. *Neuroscience Letters*, 301(1), 59-63.
- Lovestone, S., & McLoughlin, D. M. (2002). Protein aggregates and dementia: Is there a common toxicity? *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 72(2), 152-161.
- Lundblad, M., Vaudano, E., & Cenci, M. A. (2003). Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of 1-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry*, 84(6), 1398-1410.
- Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M. M., & Richmond, T. J. (1997). Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *Journal of Molecular Biology*, 272(3), 301-311. doi:10.1006/jmbi.1997.1235
- MacCollin, M., Peterfreund, R., MacDonald, M., Fink, J. S., & Gusella, J. (1994). Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. *Genomics*, 20(2), 332-333. doi:10.1006/geno.1994.1181
- Malo, M. S., Mozumder, M., Zhang, X. B., Biswas, S., Chen, A., Bai, L. C., et al. (2006). Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(4), G737-46. doi:10.1152/ajpgi.00394.2005
- Martinez-Mir, M. I., Probst, A., & Palacios, J. M. (1991). Adenosine A2 receptors: Selective localization in the human basal ganglia and alterations with disease. *Neuroscience*, 42(3), 697-706.
- Mato, J. M., Alvarez, L., Ortiz, P., & Pajares, M. A. (1997). S-adenosylmethionine synthesis: Molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), 265-280.
- Meghji, P., Tuttle, J. B., & Rubio, R. (1989). Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture. *Journal of Neurochemistry*, 53(6), 1852-1860.
- Merchant, J. L., Demediuk, B., & Brand, S. J. (1991). A GC-rich element confers epidermal growth factor responsiveness to transcription from the gastrin promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 11(5), 2686-2696.

- Merchant, J. L., Iyer, G. R., Taylor, B. R., Kitchen, J. R., Mortensen, E. R., Wang, Z., et al. (1996). ZBP-89, a kruppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 16(12), 6644-6653.
- Merchant, J. L., Shiotani, A., Mortensen, E. R., Shumaker, D. K., & Abraczinskas, D. R. (1995). Epidermal growth factor stimulation of the human gastrin promoter requires Sp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 6314-6319.
- Meyer, P. T., Elmenhorst, D., Boy, C., Winz, O., Matusch, A., Zilles, K., et al. (2007). Effect of aging on cerebral A1 adenosine receptors: A [18F]CPFPX PET study in humans. *Neurobiology of Aging*, 28(12), 1914-1924. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.005
- Milligan, G., Canals, M., Padiani, J. D., Ellis, J., & Lopez-Gimenez, J. F. (2006). The role of GPCR dimerisation/oligomerisation in receptor signalling. *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings*, (2)(2), 145-161.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M., & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 211(1), 13-16.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience Letters*, 165(1-2), 208-210.
- Morelli, M., Di Paolo, T., Wardas, J., Calon, F., Xiao, D., & Schwarzschild, M. A. (2007). Role of adenosine A2A receptors in parkinsonian motor impairment and l-DOPA-induced motor complications. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 293-309. doi:10.1016/j.pneurobio.2007.07.001
- Morello, S., Ito, K., Yamamura, S., Lee, K. Y., Jazrawi, E., Desouza, P., et al. (2006). IL-1 beta and TNF-alpha regulation of the adenosine receptor (A2A) expression: Differential requirement for NF-kappa B binding to the proximal promoter. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(10), 7173-7183.
- Nan, X., Campoy, F. J., & Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, 88(4), 471-481.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., et al. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386-389. doi:10.1038/30764
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated

VIII. Bibliografia

- protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*, 387(3), 271-280.
- Newby, A. C. (1991). Adenosine: Origin and clinical roles. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 309A, 265-270.
- Ng, H. H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C. A., Turner, B. M., Erdjument-Bromage, H., et al. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature Genetics*, 23(1), 58-61. doi:10.1038/12659
- Nguyen, N., Zhang, X., Olashaw, N., & Seto, E. (2004). Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25927-25934. doi:10.1074/jbc.M402525200
- Nicholas, A. P., Lubin, F. D., Hallett, P. J., Vattem, P., Ravenscroft, P., Bezard, E., et al. (2008). Striatal histone modifications in models of levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry*, 106(1), 486-494. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05417.x
- Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., & Bradbury, E. M. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, 57(3), 449-457.
- Obeid, R., Schadt, A., Dillmann, U., Kostopoulos, P., Fassbender, K., & Herrmann, W. (2009). Methylation status and neurodegenerative markers in parkinson disease. *Clinical Chemistry*, 55(10), 1852-1860. doi:10.1373/clinchem.2009.125021
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., Lanciego, J. L., Artieda, J., Gonzalo, N., et al. (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 23(10 Suppl), S8-19.
- Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M., et al. (2001). Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell*, 105(4), 487-497.
- Olanow, C. W., & Obeso, J. A. (2000). Preventing levodopa-induced dyskinesias. *Annals of Neurology*, 47(4 Suppl 1), S167-76; discussion S176-8.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Mehta, N., Choi, P., Hardy, J., et al. (1999). Alpha-synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(14), 5782-5791.
- Outeiro, T. F., Kontopoulos, E., Altmann, S. M., Kufareva, I., Strathearn, K. E., Amore, A. M., et al. (2007). Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5837), 516-519. doi:10.1126/science.1143780

- Panning, B., & Jaenisch, R. (1998). RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell*, 93(3), 305-308.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-36; discussion 222.
- Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(3-4), 185-191.
- Pieper, H. C., Evert, B. O., Kaut, O., Riederer, P. F., Waha, A., & Wullner, U. (2008). Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability. *Neurobiology of Disease*, 32(3), 521-527. doi:10.1016/j.nbd.2008.09.010
- Pierce, K. L., & Lefkowitz, R. J. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(10), 727-733. doi:10.1038/35094577
- Pinna, A., Fenu, S., & Morelli, M. (2001). Motor stimulant effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 do not develop tolerance after repeated treatments in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 39(3), 233-238. doi:2-K
- Pinna, A., Pontis, S., Borsini, F., & Morelli, M. (2007). Adenosine A2A receptor antagonists improve deficits in initiation of movement and sensory motor integration in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model of parkinson's disease. *Synapse (New York, N.Y.)*, 61(8), 606-614. doi:10.1002/syn.20410
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., et al. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321), 2045-2047.
- Popoli, P., Pintor, A., Domenici, M. R., Frank, C., Tebano, M. T., Pezzola, A., et al. (2002). Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: Possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1967-1975.
- Qin, S., & Parthun, M. R. (2002). Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), 8353-8365.
- Quiroz, C., Lujan, R., Uchigashima, M., Simoes, A. P., Lerner, T. N., Borycz, J., et al. (2009). Key modulatory role of presynaptic adenosine A2A receptors in cortical neurotransmission to the striatal direct pathway. *TheScientificWorldJournal*, 9, 1321-1344. doi:10.1100/tsw.2009.143
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 413-492.

VIII. Bibliografia

- Rebola, N., Rodrigues, R. J., Lopes, L. V., Richardson, P. J., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2005). Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133(1), 79-83. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.054
- Rebola, N., Sebastiao, A. M., de Mendonca, A., Oliveira, C. R., Ribeiro, J. A., & Cunha, R. A. (2003). Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *Journal of Neurophysiology*, 90(2), 1295-1303. doi:10.1152/jn.00896.2002
- Reizis, B., & Leder, P. (1999). Expression of the mouse pre-T cell receptor alpha gene is controlled by an upstream region containing a transcriptional enhancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(10), 1669-1678.
- Ren, H., & Stiles, G. L. (1995). Separate promoters in the human A1 adenosine receptor gene direct the synthesis of distinct messenger RNAs that regulate receptor abundance. *Molecular Pharmacology*, 48(6), 975-980.
- Ren, H., & Stiles, G. L. (1998). A single-stranded DNA binding site in the human A1 adenosine receptor gene promoter. *Molecular Pharmacology*, 53(1), 43-51.
- Ren, H., & Stiles, G. L. (1999). Dexamethasone stimulates human A1 adenosine receptor (A1AR) gene expression through multiple regulatory sites in promoter B. *Molecular Pharmacology*, 55(2), 309-316.
- Richmond, T. J., & Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, 423(6936), 145-150. doi:10.1038/nature01595
- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 14(1), 9-25.
- Rodriguez, A., Freixes, M., Dalfo, E., Martin, M., Puig, B., & Ferrer, I. (2005). Metabotropic glutamate receptor/phospholipase C pathway: A vulnerable target to creutzfeldt-jakob disease in the cerebral cortex. *Neuroscience*, 131(4), 825-832. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.12.023
- Rodriguez, A., Martin, M., Albasanz, J. L., Barrachina, M., Espinosa, J. C., Torres, J. M., et al. (2006). Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in creutzfeldt-jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(10), 964-975. doi:10.1097/01.jnen.0000235120.59935.f5
- Roh, T. Y., Cuddapah, S., & Zhao, K. (2005). Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes & Development*, 19(5), 542-552. doi:10.1101/gad.1272505
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10 Suppl, S10-7. doi:10.1038/nm1066

- Rougeulle, C., & Heard, E. (2002). Antisense RNA in imprinting: Spreading silence through air. *Trends in Genetics : TIG*, 18(9), 434-437.
- Ruiz, A., Sanz, J. M., Gonzalez-Calero, G., Fernandez, M., Andres, A., Cubero, A., et al. (1996). Desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in rat brain by in vivo treatment with R-PIA: Involvement of coated vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1310(1), 168-174.
- Ruiz, M. A., Albasanz, J. L., Leon, D., Ros, M., Andres, A., & Martin, M. (2005). Different modulation of inhibitory and stimulatory pathways mediated by adenosine after chronic in vivo agonist exposure. *Brain Research*, 1031(2), 211-221. doi:10.1016/j.brainres.2004.10.040
- Saito, Y., Ruberu, N. N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., et al. (2004). Staging of argyrophilic grains: An age-associated tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9), 911-918.
- Sansom, O. J., Maddison, K., & Clarke, A. R. (2007). Mechanisms of disease: Methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nature Clinical Practice.Oncology*, 4(5), 305-315. doi:10.1038/ncponc0812
- Scarpa, S., Cavallaro, R. A., D'Anselmi, F., & Fusco, A. (2006). Gene silencing through methylation: An epigenetic intervention on alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 9(4), 407-414.
- Scarpa, S., Fusco, A., D'Anselmi, F., & Cavallaro, R. A. (2003). Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: A treatment for alzheimer disease? *FEBS Letters*, 541(1-3), 145-148.
- Schwarzschild, M. A., Agnati, L., Fuxe, K., Chen, J. F., & Morelli, M. (2006). Targeting adenosine A2A receptors in parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 29(11), 647-654. doi:10.1016/j.tins.2006.09.004
- Selley, M. L. (2004). Increased homocysteine and decreased adenosine formation in alzheimer's disease. *Neurological Research*, 26(5), 554-557. doi:10.1179/016164104225016182
- Sergeant, N., Delacourte, A., & Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1739(2-3), 179-197. doi:10.1016/j.bbadis.2004.06.020
- Shi, Y., Lee, J. S., & Galvin, K. M. (1997). Everything you have ever wanted to know about yin yang 1..... *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1332(2), F49-66.
- Simola, N., Morelli, M., & Pinna, A. (2008). Adenosine A2A receptor antagonists and parkinson's disease: State of the art and future directions. *Current Pharmaceutical Design*, 14(15), 1475-1489.
- Slesarev, A. I., Belova, G. I., Kozyavkin, S. A., & Lake, J. A. (1998). Evidence for an early prokaryotic origin of histones H2A and H4 prior to the emergence of eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 26(2), 427-430.

VIII. Bibliografia

- Smith, M. M. (2002). Centromeres and variant histones: What, where, when and why? *Current Opinion in Cell Biology*, 14(3), 279-285.
- Soma, M., Nakayama, T., Satoh, M., Uwabo, J., Rahmutula, D., Takahashi, Y., et al. (1998). A T1083C polymorphism in the human adenosine A2a receptor gene is not associated with essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 11(12), 1492-1494.
- Sperlagh, B., Zsilla, G., Baranyi, M., Kekes-Szabo, A., & Vizi, E. S. (1997). Age-dependent changes of presynaptic neuromodulation via A1-adenosine receptors in rat hippocampal slices. *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 15(6), 739-747.
- Spillantini, M. G., Divane, A., & Goedert, M. (1995). Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35. *Genomics*, 27(2), 379-381. doi:10.1006/geno.1995.1063
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840. doi:10.1038/42166
- Spillantini, M. G., Van Swieten, J. C., & Goedert, M. (2000). Tau gene mutations in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Neurogenetics*, 2(4), 193-205.
- Srinivasan, L., Pan, X., & Atchison, M. L. (2005). Transient requirements of YY1 expression for PcG transcriptional repression and phenotypic rescue. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(4), 689-699. doi:10.1002/jcb.20562
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., & O'Callaghan, J. P. (2002). Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for parkinson's disease. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(11), 1474-1476. doi:10.1096/fj.02-0216fje
- Sriram, K., Matheson, J. M., Benkovic, S. A., Miller, D. B., Luster, M. I., & O'Callaghan, J. P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: Role of TNF-alpha. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 670-682. doi:10.1096/fj.05-5106com
- St Hilaire, C., Carroll, S. H., Chen, H., & Ravid, K. (2009). Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *Journal of Cellular Physiology*, 218(1), 35-44. doi:10.1002/jcp.21579
- Steger, D. J., & Workman, J. L. (1996). Remodeling chromatin structures for transcription: What happens to the histones? *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 18(11), 875-884. doi:10.1002/bies.950181106

- Sterner, D. E., & Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(2), 435-459.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45. doi:10.1038/47412
- Straub, T., & Becker, P. B. (2007). Dosage compensation: The beginning and end of generalization. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), 47-57. doi:10.1038/nrg2013
- Svenningsson, P., Hall, H., Sedvall, G., & Fredholm, B. B. (1997). Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: An extended autoradiographic study. *Synapse (New York, N.Y.)*, 27(4), 322-335. doi:2-E
- Tadepally, H. D., Burger, G., & Aubry, M. (2008). Evolution of C2H2-zinc finger genes and subfamilies in mammals: Species-specific duplication and loss of clusters, genes and effector domains. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 176. doi:10.1186/1471-2148-8-176
- Takai, D., & Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3740-3745. doi:10.1073/pnas.052410099
- Taniuchi, T., Mortensen, E. R., Ferguson, A., Greenson, J., & Merchant, J. L. (1997). Overexpression of ZBP-89, a zinc finger DNA binding protein, in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 233(1), 154-160. doi:10.1006/bbrc.1997.6310
- Thomas, J. O., & Kornberg, R. D. (1975). Cleavable cross-links in the analysis of histone-histone associations. *FEBS Letters*, 58(1), 353-358.
- Thomas, M. J., & Seto, E. (1999). Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: Are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*, 236(2), 197-208.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J., et al. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), 996-1001. doi:10.1038/nsmb.1658
- Tobin, A. B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: Where, when and by whom. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl 1, S167-76. doi:10.1038/sj.bjp.0707662
- Togo, T., Sahara, N., Yen, S. H., Cookson, N., Ishizawa, T., Hutton, M., et al. (2002). Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(6), 547-556.
- Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Schofield, P. R., & Sutherland, G. R. (1995). Localization of the adenosine A1 receptor subtype gene (ADORA1) to chromosome 1q32.1. *Genomics*, 26(2), 423-425.

VIII. Bibliografia

- Tufarelli, C., Stanley, J. A., Garrick, D., Sharpe, J. A., Ayyub, H., Wood, W. G., et al. (2003). Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nature Genetics*, 34(2), 157-165. doi:10.1038/ng1157
- Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., et al. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 11282-11286.
- Ulas, J., Brunner, L. C., Nguyen, L., & Cotman, C. W. (1993). Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in alzheimer hippocampus: A quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, 52(4), 843-854.
- Ulrich, H. D. (2009). Preface. ubiquitin, SUMO and the maintenance of genome stability. *DNA Repair*, 8(4), 429. doi:10.1016/j.dnarep.2009.01.012
- Urdinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V., & Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: Genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurology*, 8(11), 1056-1072. doi:10.1016/S1474-4422(09)70262-5
- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A., & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell*, 19(3), 381-391. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.011
- Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Gessi, S., Casetta, I., Granieri, G., et al. (2009). A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF- α levels, correlate with motor symptoms in parkinson's disease. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, doi:10.1096/fj.09-141044
- von Zeidler, S. V., Miracca, E. C., Nagai, M. A., & Birman, E. G. (2004). Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *International Journal of Molecular Medicine*, 14(5), 807-811.
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R., & Bestor, T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*, 20(2), 116-117. doi:10.1038/2413
- Wan, W., Sutherland, G. R., & Geiger, J. D. (1990). Binding of the adenosine A2 receptor ligand [3H]CGS 21680 to human and rat brain: Evidence for multiple affinity sites. *Journal of Neurochemistry*, 55(5), 1763-1771.
- Wang, Y., Kobori, J. A., & Hood, L. (1993). The ht beta gene encodes a novel CACCC box-binding protein that regulates T-cell receptor gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5691-5701.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., et al. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8), 847-854. doi:10.1038/nn1276

- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., et al. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457-466. doi:10.1038/ng1990
- Wieczorek, E., Lin, Z., Perkins, E. B., Law, D. J., Merchant, J. L., & Zehner, Z. E. (2000). The zinc finger repressor, ZBP-89, binds to the silencer element of the human vimentin gene and complexes with the transcriptional activator, Sp1. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12879-12888.
- Wilkinson, F. H., Park, K., & Atchison, M. L. (2006). Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19296-19301. doi:10.1073/pnas.0603564103
- Wilson, V. L., & Jones, P. A. (1983). DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4601), 1055-1057.
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., & Cutler, R. G. (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 9948-9951.
- Wong, A. H., Gottesman, I. I., & Petronis, A. (2005). Phenotypic differences in genetically identical organisms: The epigenetic perspective. *Human Molecular Genetics*, 14 Spec No 1, R11-8. doi:10.1093/hmg/ddi116
- Woulfe, J. (2008). Nuclear bodies in neurodegenerative disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1783(11), 2195-2206. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.005
- Yamada, A., Takaki, S., Hayashi, F., Georgopoulos, K., Perlmutter, R. M., & Takatsu, K. (2001). Identification and characterization of a transcriptional regulator for the lck proximal promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18082-18089. doi:10.1074/jbc.M008387200
- Yamamoto, M., Gotz, M. E., Ozawa, H., Luckhaus, C., Saito, T., Rosler, M., et al. (2000). Hippocampal level of neural specific adenylyl cyclase type I is decreased in alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1535(1), 60-68.
- Yao, Y. L., Dupont, B. R., Ghosh, S., Fang, Y., Leach, R. J., & Seto, E. (1998). Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1. *Nucleic Acids Research*, 26(16), 3776-3783.
- Yasui, D. H., Peddada, S., Bieda, M. C., Vallero, R. O., Hogart, A., Nagarajan, R. P., et al. (2007). Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19416-19421. doi:10.1073/pnas.0707442104
- Ye, S., Whatling, C., Watkins, H., & Henney, A. (1999). Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89. *FEBS Letters*, 450(3), 268-272.

VIII. Bibliografia

- Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics : TIG*, 13(8), 335-340.
- Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y., & Nakata, H. (2002). Hetero-oligomerization of adenosine A1 receptors with P2Y1 receptors in rat brains. *FEBS Letters*, 531(2), 299-303.
- Yoshioka, K., Miki, T., Katsuya, T., Ogihara, T., & Sakaki, Y. (1991). The 717Val----ile substitution in amyloid precursor protein is associated with familial alzheimer's disease regardless of ethnic groups. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178(3), 1141-1146.
- Yossifoff, M., Kisliouk, T., & Meiri, N. (2008). Dynamic changes in DNA methylation during thermal control establishment affect CREB binding to the brain-derived neurotrophic factor promoter. *The European Journal of Neuroscience*, 28(11), 2267-2277. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06532.x
- Yu, L., Frith, M. C., Suzuki, Y., Peterfreund, R. A., Gearan, T., Sugano, S., et al. (2004). Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Research*, 1000(1-2), 156-173. doi:10.1016/j.brainres.2003.11.072
- Zhang, X., Odom, D. T., Koo, S. H., Conkright, M. D., Canettieri, G., Best, J., et al. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4459-4464. doi:10.1073/pnas.0501076102
- Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., & Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*, 13(15), 1924-1935.
- Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*, 15(18), 2343-2360. doi:10.1101/gad.927301
- Zhou, Q., Gedrich, R. W., & Engel, D. A. (1995). Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by a direct interaction with ATF/CREB. *Journal of Virology*, 69(7), 4323-4330.
- Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., et al. (2006). Truncated tau from sporadic alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Letters*, 580(15), 3582-3588. doi:10.1016/j.febslet.2006.05.029
- Zimmermann, H., & Braun, N. (1996). Extracellular metabolism of nucleotides in the nervous system. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 16(6), 397-400.

IX. Resultats Annexos

Elevats nivells estriatals de Yin yang-1 a la malaltia de Parkinson : possible paper repressor en l'expressió del receptor d'adenosina A_{2A}

Sandra P. Buirra, Guido Dentesano, José Luis Albasanz, Jesús Moreno, Salvador Juvés, Mairena Martín, Isidre Ferrer i Marta Barrachina.

La modulació farmacològica per antagonistes específics del receptor d'adenosina A_{2A} (A_{2A}R) ha demostrat disminuir les discapacitats que desenvolupen els pacients de Parkinson (PD) com a conseqüència del tractament amb levodopa. En el nostre estudi hem observat un increment de l'expressió del A_{2A}R en el nucli estriat de malalts amb PD sense cap tractament farmacològic previ. En el **Treball 1.3** vam demostrar que la metilació juga un paper en l'expressió basal del A_{2A}R. En el present treball, no hem observat pèrdua en el percentatge de metilació a la regió 5' UTR del gen *ADORA2A* a PD. Paral·lelament, després d'un estudi bioinformàtic (MatInspector) vam seleccionar dos factors de transcripció candidats a tenir un paper en el control de l'expressió del A_{2A}R: Yin Yang-1 (YY1) i ZBP-89. Mitjançant l'ús de vectors d'expressió i d'ARN d'interferència hem demostrat que YY1 té un paper inhibidor i ZBP-89 un paper activador en les cèl·lules SH-SY5Y. A més, mitjançant l'assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) hem determinat que el paper d'aquests factors de transcripció és a través d'una interacció directa sobre la regió 5'UTR del gen *ADORA2A*. Per altra banda, tot i no observar canvis d'expressió de ZBP-89 en el nucli estriat de pacients amb PD, el YY1 està augmentat tant a nivell de ARNm com de proteïna. A més, hem observat que YY1 està localitzat al nucli de les cèl·lules positives per A_{2A}R mitjançant microscopia confocal. En conclusió, ZBP-89 i YY1 regulen l'expressió basal del A_{2A}R. I donat que s'ha descrit que l'expressió de YY1 està regulada per AMPc, els nivells estriatals elevats del YY1 poden representar un mecanisme de regulació retrògrada del A_{2A}R per reduir els seus alts nivells a PD.

ABSTRACT

Adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}Rs) are G-protein coupled receptors that stimulate adenylyl cyclase activity, promoting accumulation of intracellular cAMP. Pharmacological modulation of A_{2A}Rs is particularly useful in Parkinson's disease (PD) and has been tested in schizophrenia, due to their property of antagonizing dopamine D₂ receptor activity. We have recently described how DNA methylation controls basal A_{2A}R expression levels. In the present report, we show that A_{2A}Rs are increased in the putamen post-mortem of PD patients non pharmacologically-treated with respect to age-matched controls, although it has not been associated with DNA methylation lost in the 5'UTR region of A_{2A}R gene (*ADORA2A*), measured with SEQUENOM MassArray platform. In parallel, the transcription factors ZBP-89 and Yin Yang-1 (YY1) have been characterized as regulators of *ADORA2A* in SH-SY5Y cells by specific expression vectors/siRNAs transient transfections and chromatin immunoprecipitation assay. ZBP-89 plays a role as an activator and YY1 as a repressor of basal A_{2A}Rs levels. Interestingly, striatal YY1 levels are upregulated at mRNA and protein levels in PD while striatal ZBP-89 levels remain unchanged with respect to age-matched controls. In contrast, striatal positive-A_{2A}R neurons present nuclear YY1 localization with confocal immunofluorescence.

These findings provide new insights into the molecular mechanisms underlying basal *ADORA2A* expression and increased striatal YY1 levels in PD might represent a cellular response to reduce A_{2A}Rs levels.

INTRODUCTION

Adenosine is an endogenous purine nucleoside that mediates a wide variety of physiological functions by interaction with four G-protein coupled receptors which modulate adenylate cyclase activity: A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃ (Fredholm et al., 2001). In the central nervous system (CNS), A₁Rs are associated with neuroprotective processes and they are upregulated in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates (Angulo et al., 2003; Rodríguez et al., 2006; Perez-Buira et al., 2007; Albasanz et al., 2007, 2008). By contrast, A_{2A}Rs activity is related to the modulation of glutamate release in the brain and it is associated with the outcome of cerebral injury as well as the development of A β -induced synaptotoxicity (Cunha, 2005; Stone et al., 2009; Canas et al., 2009). The most enriched A_{2A}Rs brain region is the striatum, in which A_{2A}Rs are largely restricted to GABAergic neurons of the indirect pathway, projecting from the caudate putamen (CPu) to the external globus pallidus (GPe), which also expresses dopamine D₂ receptors (D₂Rs) (Fuxe et al., 2007). Moreover, A_{2A}Rs play out antagonistic interactions with D₂Rs and A₁Rs (Ferré et al., 1991; Ciruela et al., 2006), whereas they synergize with metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR₅) (Ferré et al., 2002). As a result of these interactions, antagonists of A_{2A}Rs have recently emerged as a leading candidate class of non-dopaminergic anti-parkinsonian agents, facilitating the availability of D₂Rs (Schwarzschild et al., 2006). In fact, clinical trials have proven that antagonists reduce the postsynaptic effects of dopamine depletion and lessen motor symptoms of Parkinson's disease (PD) (Bara-Jimenez et al., 2003; LeWitt et al., 2008; Simola et al., 2008; Pinna, 2009). Moreover, therapeutic uses of A_{2A}Rs modulation are not restricted to PD, as blockade of these receptors has been shown to be beneficial in animal models of epilepsy, ischemia and Huntington disease (Jones et al., 1998; Chen et al., 1999; Popoli et al., 2002). However, few reports have been focused

on A_{2A}R gene (*ADORA2A*) transcription regulation (St. Hilaire et al., 2009) which is localized to chromosome 22 (MacCollin et al., 1994; Le et al., 1996; Peterfreund et al., 1996). We have recently shown that DNA methylation plays a role in its basal expression in several human cell lines (Buirra et al., In press). Regarding A_{2A}R expression levels in Parkinson's disease (PD), it was reported to be upregulated at mRNA and protein levels in the post-mortem putamen of PD patients with dyskinesias (Calon et al. 2004) and A_{2A}Rs overexpression has recently been correlated with the typical parkinsonian motor symptoms (Varani et al., 2009). Therefore, based on these findings, our study was designed to: a) determine the striatal A_{2A}R levels in PD patients without previous pharmacological treatment; b) learn about the role of DNA methylation in the expression of this receptor in the putamen post-mortem of PD with respect to age-matched controls and; c) identify and figure out the role of several transcription factors in basal and pathological *ADORA2A* expression.

MATERIAL AND METHODS

Human brain samples

The human post-mortem brain samples were obtained from brain banks of the Institute of Neuropathology (Hospital of Bellvitge) and the University of Barcelona (Clinic Hospital). The donation and obtaining of samples (central nervous system) are regulated by the ethics committees of the two institutions. The sample processing followed the rules of the European Consortium of Nervous Tissues: BrainNet Europe II (BNEII). All the samples are protected in terms of individual donor identification following the BNEII laws. The brains are maintained, half in formalin for morphological and immunohistochemical studies, while the other half is processed in coronal sections to be frozen at -80°C and made available for biochemical studies. The neuropathological exams were realized in all cases on twenty sections of brain, both cerebel and brainstem, stained with haematoxylin and eosin, luxol fast blue-Klüver Barrera, and subjected to immunohistochemistry for tau, β -A4 amyloid, α -synuclein, α -Bcrystalin and ubiquitin. This is the first approximation toward a neuropathological diagnosis of the disease. Control brains were from individuals without neurological history or neuropathological lesions after the standard exam. The neuropathological diagnoses were made according to well-established criteria for Parkinson's disease (PD) (Braak et al., 2003). All cases analyzed are summarized in Table 1.

Cell culture

Human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was maintained in DMEM medium (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain) (ECACC number: 94030304) supplemented with 10% fetal bovine serum. Depending on experimental conditions, cells were maintained in culture with 10 μ M of retinoic acid (RA) (Sigma, Madrid, Spain) which

was added every 48 hours. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Quantitative DNA methylation analysis

DNA purification, bisulfite treatment and quantitative DNA methylation analysis by MassArray platform of SEQUENOM were performed as recently described (Barrachina and Ferrer, 2009). Five loci of 5' UTR of *ADORA2A* gene were analyzed to learn their percentage of DNA methylation. Primers for each region were designed using MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Every reverse primer presented a T7-promoter tagged to obtain an appropriate product for *in vitro* transcription and an 8 bp insert to prevent abortive cycling. The forward primers contained a 10mer-tagged to balance the PCR primer length. The sequences of primers used for amplification of bisulfite-treated DNA were (tags incorporated are indicated below in lower case and underlined):

A_{2A}R-10069 (PCR 1): forward, 5'-
aggaagagagTTAGTTTGATTAATATGGTGAAATAT-3', reverse, 5'-
cagtaatacgactcactatagggagaaggctCCCCCTACAAACAACCTTTAAAAC-3';

A_{2A}R-8973 (PCR 2): forward, 5'-aggaagagagGAGTTTTTTTAGTAGGGATGGAT-3',
reverse, 5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctAACCTAAAACCCAACCCTAAATCT-3';

A_{2A}R-7883 (PCR 3): forward, 5'-aggaagagagTTTTTAGTGTTGAGTTGGTTGAGTT-
3', reverse, 5'-
cagtaatacgactcactatagggagaaggctACAATCCCTATAATATCCCCTAACCC-3';

A_{2A}R-6643 (PCR 4): forward, 5'-aggaagagagAGTATAGGGGATGATGGGAGTTTA-
3', reverse, 5'-
cagtaatacgactcactatagggagaaggctACCAAACAAAACCTAACCCTACTACTT-3';

A_{2A}R-5301 (PCR 5): forward, 5'-aggaagagagTGGTTGTTTATTATTGGGTAGTGAG-
3', reverse, 5'-
cagtaatacgactcactatagggagaaggctCAAAAACCTTTAAAATCTCCAAAAA-3'.

More detailed information about these primers and PCR reactions is found in Table 2.

ZBP-89 and YY1 siRNA transfection

SH-SY5Y cells were plated on 6-well dishes at a concentration of 50,000 cells/well and cultured overnight before siRNA transfection. Then cells were transfected with 100 pmol of ZBP-89 siRNA (5'-GGUGAUGAGACAAACCAUGtt-3'; Ambion, siRNA ID# 109422, Madrid, Spain), YY1 siRNA (5'-GGAGGACAAUUCAUGAACUtt-3'; Ambion, siRNA ID# 107093) and a negative control or scramble siRNA (Ambion, Cat. N°4611) using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) following the instructions of the manufacturer. After 5 hours of transfection, the medium was replaced with fresh medium. For YY1 siRNA transfection, cells were treated again with 10 μ M RA for 48 hours.

Cell transfection with ZBP-89 and YY1 expression vector

SH-SY5Y cells were plated in 6-well dishes at a concentration of 10⁵ cells/well and cultured overnight before transfection. 1 μ g of ZBP-89 vector (kindly provided by Dr. W. Hammerschmidt) or 1 μ g of pCMV/HA-YY1 vector (kindly provided by Dr. Shi) were transfected using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen, El Prat de Llobregat, Spain) following the instructions of the manufacturer. After 5 h of transfection, the medium was replaced by fresh medium. YY1 overexpression in RA-treated SH-SY5Y cells was carried out in the same way as described for siRNA transfection.

RNA purification

The purification of RNA from cell lines was carried out with RNeasy Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the protocol provided by the manufacturer. The

concentration of each sample was obtained from A_{260} measurements with Nanodrop 1000. RNA integrity was tested using the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA).

Retrotranscription reaction

The retrotranscriptase reaction was carried out using the High capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain) following the protocol provided by the supplier. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of MultiScribe Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA.

TaqMan PCR

TaqMan PCR assays for every gene were performed in duplicate on cDNA samples in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). For each 20 μ l TaqMan reaction, 9 μ l cDNA (diluted 1/20, which corresponds approximately to the cDNA from 22 ng of RNA) was mixed with 1 μ l 20x TaqMan Gene Expression Assays and 10 μ l of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Parallel assays for each sample were carried out using primers and probe for β -glucuronidase (GUSB) for normalization. Standard curves were prepared for every gene analyzed using serial dilutions of SH-SY5Y cells. The PCR conditions and TaqMan probe information are the same as previously described (Albasanz et al., 2008). Finally, all TaqMan PCR data were captured using the Sequence Detector Software (SDS version 1.9, Applied Biosystems). The identification number for ZBP-89 and YY1 TaqMan probes were Hs00222661_m1 and Hs00231533_m1, respectively (Applied Biosystems).

Western Blot

Retinoic acid-treated and non-treated SH-SY5Y cells were lysed with RIPA buffer. Lysates were maintained in agitation for 30 minutes at 4°C and then centrifuged at

15,000 g for 12 minutes at 4°C. Striatal plasma membrane extracts from human post-mortem samples were purified as described (Pérez-Buira et al., 2007). Protein concentration was determined with BCA (Pierce, Woburn, MA) method. 20 µg of the resultant supernatant was used for Western blot analysis as described (Perez-Buira et al., 2007). The following antibodies were used: rabbit polyclonal A_{2A}R (ab3461, Abcam, Cambridge, UK) used at a dilution of 1:2000, rabbit polyclonal ZBP-89 (H-184, sc-48811, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) used at a dilution of 1:1000, monoclonal YY1 antibody (ab58066, Abcam) diluted 1:1000 and mouse monoclonal anti-β-actin (clone AC-74, Sigma) diluted 1:5,000.

Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP)

Chromatin shearing was obtained from 10,000 retinoic acid-treated and non-treated SH-SY5Y cells for 48 hours, using the BioruptorTM from Diagenode (Liege, Belgium). The resultant DNA (between 200-500 bp) was immunoprecipitated with 10 µg of an anti-ZBP89 (H-184X, Santa Cruz Biotechnology) or 2 µg of an anti-YY1 (C-20X, Santa Cruz Biotechnology). As negative control, an immunoprecipitation was performed with a rabbit serum (sc-2338, Santa Cruz Biotechnology) using the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode). DNA immunoprecipitated (ChIP) and non-immunoprecipitated (Input) were stored in 150 µl of water. The analysis of ChIP was performed by *real time* PCR using SYBR green technology (Applied Biosystems). Input DNA and ChIP (5 µl) were amplified in triplicates in 384-well optical plates using an ABI Prism 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems). The PCR reaction was carried out with 0.5 µl of forward and reverse primers (10 µM) and 12.5 µl of master mix in a final volume of 25 µl. The sequence and the PCR product length for each locus are indicated in Tables 4 and 6. The reactions were performed using the following parameters: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. All real time PCR

data were captured using the Sequence Detector Software (SDS version 1.9, Applied Biosystems) and PCR products were evaluated by SYBR green melting curve analyses as well as checked by agarose gels. The value of the ChIP/Input ratio (percentage) was calculated following the instructions provided by the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode).

Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy

Dewaxed sections of human post-mortem hippocampus were stained with a saturated solution of Sudan black B (Merck, VWR Internationa/Eurolab S. L., Mollet del Valles, Spain) for 30 min to block the autofluorescence of lipofuscin granules present in nerve cell bodies, rinsed in 70% ethanol and washed in distilled water. The sections were incubated at 4°C overnight with the rabbit A_{2A}R antibody (ab3461, Abcam) used at a dilution of 1:100 and mouse YY1 antibody (ab58066, Abcam) at a dilution of 1:50. After washing in PBS, the sections were incubated in the dark with the cocktail of secondary antibodies, and then diluted in the same vehicle solution as the primary antibodies for 45 min at room temperature. Secondary antibodies were Alexa488 anti-rabbit (green) and Alexa555 anti-mouse (red) (both from Molecular Probes, Leiden, The Netherlands), and these were used at a dilution of 1:400. After washing in PBS, the sections were mounted in Immuno-Fluore Mounting medium (Biomedica, Palex Medical S.A., Barcelona, Spain), sealed and dried overnight. Nuclei were stained with TO-PRO-3-iodide (Molecular Probes) diluted 1:1,000. Sections incubated with the secondary antibodies only were used as controls. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope.

Statistical analysis

All results were analyzed with Statgraphics Plus v5 software, using ANOVA with post-hoc Scheffe test. Differences between mean values were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Striatal A_{2A} receptor (A_{2A}R) levels are increased in PD

A_{2A}R protein levels from plasma membrane extracts were measured by Western blot in the postmortem putamen of PD patients non pharmacologically-treated with respect to age-matched controls. As Fig. 1A shows, A_{2A}R protein levels were highly increased in PD cases, correlating with high A_{2A}R mRNA levels (Fig. 1B) analyzed by TaqMan PCR. A_{2A}R mRNA levels were normalized with β -glucuronidase (GUSB), which was a good endogenous control as it presented a reduced Δ Ct value (see supplemental data 1A).

DNA methylation pattern in *ADORA2A* is not modified in PD

Next, we were interested in ruling out the molecular mechanisms that played a role in A_{2A}R gene (*ADORA2A*) expression. This consists of two coding exons (exon 2 and 3) separated by a single intron of nearly 7 Kb. The exon 1 is a non-coding exon which is located at 5' upstream exon 2 and presents 6 tissue-specific isoforms: h1A-h1F (Yu et al., 2004). We have described that DNA methylation controls basal *ADORA2A* expression in several cell lines (Buirra et al., In press). Therefore, we determined the percentage of DNA methylation in striatal *ADORA2A* using the MassARRAY platform of SEQUENOM. First, we analyzed the 15.5 Kb 5' flanking region of the translation start site (ATG) of *ADORA2A* using the MethPrimer software (see Material and Methods section). Three CpG islands (CGI) were predicted surrounding exon 1E and these are schematically represented in Fig. 2A. Then, we amplified five loci by PCR after genomic DNA bisulfite treatment of striatal PD and age-matched samples (Table 1-2). The three predicted CGI were analyzed with PCRs numbers 1-3. PCR 1 covered part of the CGI#1 and CGI#2, PCR 2 matched with part of CGI#2 and PCR 3 the entire CGI#3. No loss of DNA methylation percentage in the putamen of PD cases was found

with respect to age-matched controls as a potential mechanism playing a role in the increased parkinsonian A_{2A}R mRNA levels (Fig. 2B). Exceptionally, CpG sites numbers 9 and 22 in PCR1 presented a statistically significant reduction in their percentage of DNA methylation in PD cases. We must take into account that these two loci presented a technical problem because base-specific cleavage of the *in vitro* transcription product was not discriminated by MALDI-TOF, with the same percentage of DNA methylation obtained for both CpG sites.

Finally, an additional analysis was made in two 3' flanking sequences to CGI#3 covered by PCR 4 and PCR 5 (Supplemental data 2A). Both DNA regions were found to be highly methylated in the putamen of control samples and again no differences were detected with respect to PD cases (Supplemental data 2B).

ZBP-89 is an activator of *ADORA2A*

After the epigenetic study performed in *ADORA2A*, we wanted to gain knowledge about transcription factors that regulate expression of A_{2A}R. For this purpose, an *in silico* analysis of the sequence shown in Fig. 2A was carried out using the MatInspector software (Cartharius et al., 2005). Nineteen putative DNA binding sites were predicted for the transcription factor ZBP-89, whose positions and sequence are indicated in Table 3. Next, we carried out two strategies to test whether ZBP-89 regulated *ADORA2A* expression. First, we transfected an expression vector containing the ZBP-89 cDNA (kindly provided by Dr. Hammerschmidt) in SH-SY5Y cells. Surprisingly, A_{2A}R mRNA levels were unable to be tested because ZBP-89 overexpression promoted a high percentage of cell death (data not shown). We attributed this finding to the induction of apoptosis previously described for ZBP-89 (Bai and Merchant, 2001; Bai et al., 2004). Second, the reduction of endogenous ZBP-89 protein levels with a specific siRNA (Fig. 3A) promoted a decrease in the basal A_{2A}R mRNA levels (Fig. 3B). The results were

specific as the transfection of the scramble (sc) siRNA didn't modify the endogenous ZBP-89 and A_{2A}R levels. Moreover, the analysis of siRNA transfection was performed by TaqMan PCR using the β -glucuronidase (GUSB) as endogenous control, which was not modified in these experimental conditions as it presented a reduced Δ Ct value. Therefore, these results indicated that ZBP-89 is an activator of basal A_{2A}R mRNA levels in SH-SY5Y cells. Finally, we checked whether the role of ZBP-89 on *ADORA2A* expression was directly through an interaction with the 5' UTR region. Then, a chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out in SH-SY5Y cells. After cross-linking of proteins and DNA with formaldehyde, sonicated cell lysates from these cells were subjected to immunoprecipitation with the rabbit polyclonal anti-ZBP89 antibody. The precipitated DNA fragments were amplified with four sets of primers including seven ZBP-89 binding sites of the nineteen predicted in *ADORA2A* (Table 4, Fig. 4A). ChIP PCR products were detected with the ZBP-89 antibody but not with the rabbit serum used as a negative control (IgG) nor with the magnetic beads included in the commercial kit used, except ZBP-89 binding site #2, whose immunoprecipitation was unspecific as it was amplified in the same way using the rabbit serum (Fig. 4B). As positive control, a PCR product covering a locus in the gastrin gene promoter region was obtained with the ZBP-89 antibody (Fig. 4C), as previously described (Merchant et al., 1996). The SyBrGreen PCR reactions performed in the analysis of each ChIP only amplified one specific PCR product as dissociation curve plots show (Supplemental data 3). In conclusion, these results show that ZBP-89 acts as an activator and that it binds to *ADORA2A*.

YY1 is a repressor of *ADORA2A*

The MatInspector analysis also revealed another candidate to regulate *ADORA2A* expression. Seven putative binding sites for YY1 were predicted (Fig. 5A and Table 5).

To find out its potential role in *ADORA2A* expression, several functional analyses were carried out. First of all, as the transfection of a specific YY1 siRNA in SH-SY5Y didn't show an effect on A_{2A}R mRNA levels (data not shown), we treated SH-SY5Y cells with 10 μM retinoic acid (RA) for 48 hours to reduce the endogenous A_{2A}R mRNA levels (Fig. 5B). In these experimental conditions (the procedure is drawn in Fig. 5C), the reduction of endogenous YY1 protein levels with a specific siRNA (Fig. 5D) promoted an increase in the A_{2A}R mRNA levels (Fig. 5E). The results obtained were specific as the transfection of a scramble (sc) siRNA didn't modify the endogenous YY1 and A_{2A}R levels (Fig. 5D,E). The endogenous control used in the TaqMan PCR analysis was GUSB and it was unaltered in the experimental conditions used (Fig. 5F). In parallel, we transfected an expression vector containing the HA-YY1 cDNA (kindly provided by Dr. Shi) in RA-treated SH-SY5Y cells (Fig. 5G). The YY1 overexpression promoted a reduction of endogenous A_{2A}R mRNA levels (Fig. 5H) without modifying GUSB levels (Fig. 5I). Finally, a ChIP assay was also performed with a rabbit YY1 antibody. As Fig. 6A shows, the four sets of primers covering the seven YY1 bindings sites in *ADORA2A* showed amplification in the YY1 immunoprecipitation, indicating that this transcription factor interacts with at least four of these loci predicted in *ADORA2A* (Table 6). The results obtained were specific as the immunoprecipitation with a rabbit serum didn't present any amplification with the set of primers mentioned. The same results were obtained in SH-SY5Y cells (data not shown). As positive control of YY1 immunoprecipitation, a PCR product was obtained in a locus of c-fos gene, as previously reported (Natesan and Gilman, 1993) (Fig. 6B). All the PCR products obtained were confirmed in the analysis of their dissociation curve plots (Supplemental data 4).

In conclusion, these analyses show that YY1 acts as a repressor and that it binds to *ADORA2A*.

Characterization of the striatal ZBP-89 and YY1 levels in PD

Based on the *in vitro* findings described above, we checked the protein levels of ZBP-89 and YY1 in total homogenates from the putamen of PD patients and age-matched controls by Western blot. No differences were found regarding ZBP-89, but increased YY1 expression was observed in protein and mRNA levels in the putamen of PD cases (Fig. 7B,C). Next, double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy disclosed nuclear YY1 immunoreactivity in striatal A_{2A}R positive neurons in PD (Fig. 8, A-F). These changes were specific, as no immunoreaction was elicited following incubation with the secondary antibodies alone (Fig. 8, G-I).

DISCUSSION

A_{2A}Rs are highly expressed in the CPu and an increase in their expression was observed in PD patients with dyskinesias, attributing this upregulation to the effect of L-dopa treatment (Calon et al., 2004). Recently, it has been proven that high A_{2A}Rs levels correlate with motor symptoms in PD patients who were previously treated with a wide spectrum of drugs and not restricted to only L-dopa (Varani et al., 2009). This issue has been quite controversial, as increased striatal levels of A_{2A}Rs were shown in 6-hydroxidopamine (6-OHDA)-treated rats, as a consequence of dopamine denervation (Pinna et al., 2002), and also in 6-OHDA-treated rats with intermittent L-dopa treatment (Tomiyama et al., 2004). In our study, we only analyzed PD patients with no previous pharmacological treatment. Our results also show an increase in striatal A_{2A}Rs levels, reinforcing the notion that this upregulation is not due to the effect of L-dopa. Then, we were interested in elucidating the molecular mechanisms underlying the upregulation of striatal A_{2A}Rs levels in PD. DNA methylation is associated with gene repression (Illingworth and Bird, 2009) and we have described how this epigenetic mark regulates the expression of basal A_{2A}R levels (Buirá et al., In press). Then, we proceeded to measure the DNA methylation profile in *ADORA2A*. No DNA methylation percentage loss was found in the 5' UTR region of *ADORA2A* in the post-mortem putamen of PD patients with respect to age-matched controls, except in two CpG sites located in the CpG islands (CGIs) #1 and #2 (PCR 1, Fig. 2B). We have no explanation for this finding as an *in silico* analysis did not reveal any putative binding site for a transcription factor candidate in these particular loci. However, the gene repression role performed by methyl-binding proteins (MBDs) is well known (Lopez-Sierra and Esteller, 2008). Therefore, it is also plausible that striatal A_{2A}Rs levels in PD are increased due to a loss of affinity of MBDs to *ADORA2A*, but this aspect remains unresolved as it is technically

impossible measure using human post-mortem brain samples. Apart from that, it is established that CGIs are usually unmethylated in normal cells (Weber et al., 2007), while hypermethylation of CGIs is a major event in many cancers (Herman and Baylin, 2003). It is noteworthy that the MassArray analysis performed on *ADORA2A* revealed that the predicted bioinformatically CGI #3 can be considered as a non-CGI, as it is highly methylated in the post-mortem putamen of age-matched controls. Regarding the low percentage of DNA methylation in CGIs #1 and #2, this shows the possibility of drug intervention to reduce the A_{2A}Rs levels in PD. In fact, the analysis carried out in SH-SY5Y and U87-MG cell lines showed a reduction of this receptor after S-adenosylmethionine treatment (Buirra et al., In press). In line with this, the use of epigenetic tools has been proposed in the treatment of Alzheimer's disease and PD (Scarpa et al., 2003, 2006; Obeid et al., 2009).

After DNA methylation analysis, we proceeded to find some transcription factors related to *ADORA2A* expression. Its transcriptional regulation has been less studied, and only a few transcription factors have been associated with *ADORA2A* expression (St. Hilaire et al., 2009). In the present report, the analysis carried out with the MatInspector software revealed nineteen and seven binding sites for the transcription factors ZBP-89 and Yin Yang-1 (YY1), respectively, in the 5' UTR region of *ADORA2A*.

ZBP-89 (also known as BFCOL1, BERF-1 and ZNF-148) is a Kruppel-type zinc-finger transcription factor that was first characterized as a repressor of gastrin gene expression (Merchant et al., 1996). Its expression is ubiquitous and it binds to a GC-rich element. It acts as a repressor (Law et al., 1998; Wiczorek et al., 2000; Keates et al., 2001) or as an activator (Ye et al., 1999; Yamada et al., 2001; Bai and Merchant, 2003; Malo et al., 2006), depending on the gene promoter. Further, several studies have revealed that ZBP-89 possesses multiple functions. It mediates cell growth arrest through the

activation of p21(Waf1), after recruiting the co-activator p300 to the p21(Waf1) promoter (Hasegawa et al., 1999; Bai and Merchant, 2000). Overexpression of ZBP-89 leads to cell cycle arrest and apoptosis both in cell culture (Bai and Merchant, 2001) and in intestinal tissues upon targeted transgenic expression (Law et al., 2006). These findings may justify the low SH-SY5Y viability after ZBP-89 overexpression and the consequent technical impossibility of analyzing its role in *ADORA2A* expression. Interestingly, the use of a specific siRNA revealed its role as a gene activator. However, no changes in striatal ZBP-89 levels were found between PD patients and age-matched controls, and confocal microscopy analysis didn't reveal a specific ZBP-89 subcellular distribution in pathological cases (data not shown). Furthermore, it has been described that ZBP-89 can be phosphorylated by ATM kinase at Ser202 potentiating p21(Waf1) induction (Bai and Merchant, 2007) and that sumoylation provides a reversible post-translational mechanism to control its activity (Chupreta et al., 2007). Thus, it can not be ruled out that striatal ZBP-89 presents a higher degree of phosphorylation or an altered sumoylation pattern in PD, but to our knowledge no commercial antibodies for phosphorylated or sumoylated ZBP-89 are available to test these hypotheses. It is also noteworthy that some of the PCRs performed in the DNA methylation studied presented ZBP-89 binding sites with CpG sites (Fig. 2B and supplemental data 2). The study revealed a low percentage of DNA methylation in ZBP-89 binding sites #10 and #12 in the putamen of PD patients and age-matched controls. Therefore, although our results don't clarify the role of ZBP-89 in parkinsonian A_{2A}R upregulation, we found reduced DNA methylation pattern in several ZBP-89 binding sites and absence of CpG sites in other ZBP-89 sequences (Table 3) where ZBP-89 was bound by ChIP assay in SH-SY5Y cells (Fig. 4B, ZBP-89 #6 and #8). Regarding Yin yang 1 (YY1), it is a ubiquitous and multifunctional zinc-finger transcription factor which acts as an initiator,

a repressor or an activator (Shi et al., 1997). Several brain genes have been reported to be regulated by YY1 (He and Casaccia-Bonofil, 2008). Its functionality has been related with basic cellular processes, such as cell-cycle control, differentiation, development and apoptosis (Affar el et al., 2006). Interestingly, it has been seen to be involved with the pathogenesis of sporadic PD as it activates G-protein-coupled receptor kinase 5, which is related to the phosphorylation of α -synuclein (Arawaka et al., 2006). In the present report, we show increased YY-1 at mRNA and proteins levels. Moreover, our *in vitro* analysis revealed that YY1 is a repressor of *ADORA2A* expression. Three types of YY1 mechanisms of action have been described including direct activation or repression, indirect activation or repression via cofactor recruitment, and activation or repression by disruption of binding sites or conformational DNA changes (Gordon et al., 2006). Further analyses are needed to elucidate the mechanism of action of YY1 above striatal *ADORA2A*. For instance, whether it forms a repression complex with HDAC1/2 (Thomas and Seto, 1999), or whether it interacts with CREB, interfering with its positive role above *ADORA2A* expression (Zhou et al., 1995; Chiang et al., 2005). Interestingly, the formation of YY1/ZBP-89 complex, reducing the ability of ZBP-89 to activate gene expression has been described (Boopathi et al., 2004). All these mechanisms must take into account the role of increased YY1 levels above striatal *ADORA2A* expression in PD. Interestingly, YY1 has been related with repression of Fas gene (Garban and Bonavida, 2001), which in turn is downregulated in PD (Ferrer et al., 2000). Consequently, YY1 upregulation might also be related to neuronal survival processes in PD.

Therefore, based on our *in vitro* analyses and several data in the literature, we propose the following hypothesis: in basal conditions ZBP-89 and YY1 control striatal *ADORA2A* expression with antagonistic roles (Fig. 9A). It is well known that A_{2A}Rs

stimulate adenylyl cyclase activity through G_s proteins, promoting accumulation of intracellular cAMP (Fredholm et al., 2001). Recent evidence has shown that the increased striatal $A_{2A}R$ s density was associated with enhanced stimulation of cAMP production, suggesting an increase in the active form of the receptor in PD (Varani et al., 2009). In contrast, YY1 has been characterized to be regulated by CREB, a target of cAMP pathway (Zhang et al., 2005). In our report, we have shown increased striatal YY1 levels in the nucleus of $A_{2A}R$ -positive neurons in PD. Therefore, it is plausible that increased YY1 levels represent a negative feedback mechanism to control the overexpression of striatal $A_{2A}R$ s levels, although other unknown YY1 activation signalling pathways also deserve to be considered (Fig. 9B).

In conclusion, this study provides new insights into the control of basal *ADORA2A* transcription in SH-SY5Y cells. Based on our previous report (Baira et al., In press) and on the evidence found in the post-mortem putamen of PD patients, it is proposed that modulation of striatal ZBP-89 and YY1 levels as well as the design of DNA methylating drugs combined with $A_{2A}R$ antagonists might be useful for future pharmacological intervention in the reduction of the dyskinesias present in PD patients.

REFERENCES

Affar el B, Gay F, Shi Y, Liu H, Huarte M, Wu S, Collins T, Li E, Shi Y (2006) Essential dosage-dependent functions of the transcription factor yin yang 1 in late embryonic development and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 26:3565-3581.

Albasanz JL, Rodríguez A, Ferrer I, Martín M (2007) Up-regulation of adenosine A1 receptors in frontal cortex from Pick's disease cases. *Eur J Neurosci* 26:3501-3508.

Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M (2008) Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18:211-219.

Angulo E, Casadó V, Mallol J, Canela EI, Viñals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R (2003) A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* 13:440-451.

Arawaka S et al. (2006) The role of G-protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. *J Neurosci* 26:9227-9238.

Bai L, Merchant JL (2000) Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *J Biol Chem* 275:30725-30733.

Bai L, Merchant JL (2001) ZBP-89 promotes growth arrest through stabilization of p53. *Mol Cell Biol* 21:4670-4683.

Bai L, Merchant JL (2003) Transcription factor ZBP-89 is required for STAT1 constitutive expression. *Nucleic Acids Res* 31:7264-7270.

Bai L, Merchant JL (2007) ATM phosphorylates ZBP-89 at Ser202 to potentiate p21waf1 induction by butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 359:817-821.

Bara-Jimenez W, Sherzai A, Dimitrova T, Favit A, Bibbiani F, Gillespie M, Morris MJ, Mouradian MM, Chase TN (2003) Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 61:293-296.

Barrachina M, Ferrer I (2009) DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in post-mortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:880-891.

Boopathi E, Lenka N, Prabu SK, Fang JK, Wilkinson F, Atchison M, Giallongo A, Avadhani NG (2004) Regulation of murine cytochrome c oxidase Vb gene expression during myogenesis: YY1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BERF-1/ZBP-89 factor. *J Biol Chem* 279:35242-35254.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211.

Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I, Barrachina M (2009) DNA methylation regulates adenosine A2A receptor cell surface expression levels. *J Neurochem* In press.

Calon F, Dridi M, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Rajput AH, Di Paolo T (2004) Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 127:1075-1084.

Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA (2009) Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 29:14741-14751.

Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21:2933-2942.

Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA (1999) A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* 19:9192-9200.

Chiang MC, Lee YC, Huang CL, Chern Y (2005) cAMP-response element-binding protein contributes to suppression of the A2A adenosine receptor promoter by mutant Huntingtin with expanded polyglutamine residues. *J Biol Chem* 280:14331-14340.

Chupreta S, Brevig H, Bai L, Merchant JL, Iñiguez-Lluhí JA (2007) Sumoylation-dependent control of homotypic and heterotypic synergy by the Kruppel-type zinc finger protein ZBP-89. *J Biol Chem* 282:36155-36166.

Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, Borycz J, Rebola N, Goldberg SR, Mallol J, Cortés A, Canela EI, López-Giménez JF, Milligan G, Lluís C, Cunha RA, Ferré S, Franco R (2006) Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 26:2080-2087.

Cunha RA (2005) Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* 1:111-134.

Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K (1991) Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7238-7241.

Ferré S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueño J, Gutiérrez MA, Casadó V, Fuxe K, Goldberg SR, Lluís C, Franco R, Ciruela F (2002) Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11940-11945.

Ferrer I, Blanco R, Cutillas B, Ambrosio S (2000) Fas and Fas-L expression in Huntington's disease and Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:424-433.

Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M (2008) Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 9:181-194.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53:527-552.

Fuxe K, Marcellino D, Genedani S, Agnati L (2007) Adenosine A(2A) receptors, dopamine D(2) receptors and their interactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22:1990-2017.

Garbán HJ, Bonavida B (2001) Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 167:75-81.

Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B (2006) Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 25:1125-1142.

Hasegawa T, Xiao H, Isobe K (1999) Cloning of a GADD34-like gene that interacts with the zinc-finger transcription factor which binds to the p21(WAF) promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 256:249-254.

He Y, Casaccia-Bonnel P (2008) The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. *J Neurochem* 106:1493-1502.

Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042-2054.

Illingworth RS, Bird AP (2009) CpG islands – “A rough guide”. *FEBS Let* 583:1713-1720.

Jones PA, Smith RA, Stone TW (1998) Protection against hippocampal kainate excitotoxicity by intracerebral administration of an adenosine A2A receptor antagonist. *Brain Res* 800:328-335.

Keates AC, Keates S, Kwon JH, Arseneau KO, Law DJ, Bai L, Merchant JL, Wang TC, Kelly CP (2001) ZBP-89, Sp1, and nuclear factor-kappa B regulate epithelial neutrophil-activating peptide-78 gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells. *J Biol Chem* 276:43713-43722.

Law GL, Itoh H, Law DJ, Mize GJ, Merchant JL, Morris DR (1998) Transcription factor ZBP-89 regulates the activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J Biol Chem* 273:19955-19964.

Law DJ, Labut EM, Merchant JL (2006) Intestinal overexpression of ZNF148 suppresses ApcMin/+ neoplasia. *Mamm Genome* 17:999-1004.

Le F, Townsend-Nicholson A, Baker E, Sutherland GR, Schofield PR (1996) Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: ADORA2A. *Biochem Biophys Res Commun* 223:461-467.

LeWitt PA, Guttman M, Tetrud JW, Tuite PJ, Mori A, Chaikin P, Sussman NM; 6002-US-005 Study Group (2008) Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces "off" time in Parkinson's disease: a double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005). *Ann Neurol* 63:295-302.

Lopez-Serra L, Esteller M (2008) Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 98:1881-1885.

MacCollin M, Peterfreund R, MacDonald M, Fink JS, Gusella J (1994) Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2A) to chromosome 22. *Genomics* 20:332-333.

Malo MS, Mozumder M, Zhang XB, Biswas S, Chen A, Bai LC, Merchant JL, Hodin RA (2006) Intestinal alkaline phosphatase gene expression is activated by ZBP-89. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:737-746.

Merchant JL, Iyer GR, Taylor BR, Kitchen JR, Mortensen ER, Wang Z, Flintoft RJ, Michel JB, Bassel-Duby R (1996) ZBP-89, a Krüppel-like zinc finger protein, inhibits epidermal growth factor induction of the gastrin promoter. *Mol Cell Biol* 16:6644-6653.

Natesan S, Gilman MZ (1993) DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev* 7:2497-2509.

Obeid R, Schadt A, Dillmann U, Kostopoulos P, Fassbender K, Herrmann W (2009) Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem* 55:1852-1860.

Perez-Buira S, Barrachina M, Rodriguez A, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I (2007) Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett* 423:194-199.

Peterfreund RA, MacCollin M, Gusella J, Fink JS (1996) Characterization and expression of the human A2a adenosine receptor gene. *J Neurochem* 66:362-368.

Pinna A, Corsi C, Carta AR, Valentini V, Pedata F, Morelli M (2002) Modification of adenosine extracellular levels and adenosine A(2A) receptor mRNA by dopamine denervation. *Eur J Pharmacol* 446:75-82.

Pinna A (2009) Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 18:1619-1631.

Popoli P, Pintor A, Domenici MR, Frank C, Tebano MT, Pèzzola A, Scarchilli L, Quarta D, Reggio R, Malchiodi-Albedi F, Falchi M, Massotti M (2002) Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *J Neurosci* 22:1967-1975.

Rodríguez A, Martín M, Albasanz JL, Barrachina M, Espinosa JC, Torres JM, Ferrer I (2006) Adenosine A1 receptor protein levels and activity is increased in the cerebral cortex in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:964-975.

Scarpa S, Fuso A, D'Anselmi F, Cavallaro RA (2003) Presenilin 1 gene silencing by S-adenosylmethionine: a treatment for Alzheimer disease? *FEBS Lett* 541:145-148.

Scarpa S, Cavallaro RA, D'Anselmi F, Fuso A (2006) Gene silencing through methylation: an epigenetic intervention on Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 9:407-414.

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M (2006) Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 29:647-654.

Simola N, Morelli M, Pinna A (2008) Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. *Curr Pharm Des* 14:1475-1489.

Shi Y, Lee JS, Galvin KM (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta* 1332:F49-F66.

Shiotani A, Merchant JL (1995) cAMP regulates gastrin gene expression. *Am J Physiol* 269: G458-G464.

St. Hilaire C, Carroll SH, Chen H, Ravid K (2009) Mechanisms of induction of adenosine receptor genes and its functional significance. *J Cell Physiol* 218:35-44.

Stone TW, Ceruti S, Abbracchio MP (2009) Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol* 193:535-587.

Thomas MJ, Seto E (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 236:197-208.

Tomiya M, Kimura T, Maeda T, Tanaka H, Kannari K, Baba M (2004) Upregulation of striatal adenosine A2A receptor mRNA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats intermittently treated with L-DOPA. *Synapse* 52:218-222.

Varani K, Vincenzi F, Tosi A, Gessi S, Casetta I, Granieri G, Fazio P, Leung E, MacLennan S, Granieri E, Borea PA (2009) A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF- α levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J*. **Sep 23 Epub ahead of print**

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457-466.

Wieczorek E, Lin Z, Perkins EB, Law DJ, Merchant JL, Zehner ZE (2000) The zinc finger repressor, ZBP-89, binds to the silencer element of the human vimentin gene and complexes with the transcriptional activator, Sp1. *J Biol Chem* 275:12879-12888.

Yamada A, Takaki S, Hayashi F, Georgopoulos K, Perlmutter RM, Takatsu K (2001) Identification and characterization of a transcriptional regulator for the Ick proximal promoter. *J Biol Chem* 276:18082-18089.

Ye S, Whatling C, Watkins H, Henney A (1999) Human stromelysin gene promoter activity is modulated by transcription factor ZBP-89. *FEBS Lett* 450:268-272.

Yu L, Frith MC, Suzuki Y, Peterfreund RA, Gearan T, Sugano S, Schwarzschild MA, Weng Z, Fink JS, Chen JF (2004) Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res* 1000:156-173.

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA (2005) Montminy M. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4459-4464.

Zhou Q, Gedrich RW, Engel DA (1995) Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by a direct interaction with ATF/CREB. *J Virol* 69:4323-4330.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Increased A_{2A}R levels are found in the putamen of Parkinson's disease patients. (A) Striatal A_{2A}R protein levels (45 kDa) from plasma membrane extracts were detected by Western Blot. β -Actin (45 kDa) is blotted to control protein loading. The information for each patient number is found in Table 1 and the image is representative of all the human cases analyzed. (B) Striatal A_{2A}R mRNA levels from total homogenates were analyzed by TaqMan PCR and normalized with β -glucuronidase (GUSB). The graph only represents the mean \pm SD of those cases shown in Table 1 with a RNA integrity number (RIN) > 7 (Ferrer et al., 2008). More information about PCR reaction is found in Supplemental data 1 and in Material and Methods section.

AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. * $p < 0.05$ compared with control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

Figure 2. The percentage of DNA methylation in three predicted CpG islands located in 5'UTR region of *ADORA2A* is not modified in Parkinson's disease patients. (A) Scaled representation of 5' UTR region of human *ADORA2A* gene established by Yu and coworkers (2004) who identified 6 isoforms of non-coding exon 1 (1A-1F). Three putative CpG islands surrounding exon 1E were predicted by MethPrimer software and are drawn in the diagram as CGI#1-3 (Buirea et al., In press). The translational start site (ATG) is indicated with an arrow. The three loci analyzed were covered by PCR 1-3 which are indicated as dotted line. (B) DNA methylation percentage of three loci amplified by PCR 1-3 in the human post-mortem putamen of patients with Parkinson's disease (PD, n=7) with respect to control samples (C, n=13). The information for every human case analyzed is found in Table 1. Graphs represent the percentage of DNA methylation (mean \pm SD) of each CpG site located in every

locus amplified by PCR (see Material and Methods section and Table 2). CpG site number 14 in PCR1 and CpG sites 28-30 in PCR2 contain ZBP-89 binding sites #12 and 10, respectively. $p < 0.001$ compared with control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

Figure 3. ZBP-89 is an activator of basal *ADORA2A* expression. (A) SH-SY5Y cells were transfected with a specific ZBP-89 siRNA and a random siRNA (scramble: sc) as described in Material and Methods section. ZBP-89 protein levels (115 kDa) were analyzed by Western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. (B) $A_{2A}R$ and ZBP-89 mRNA levels are measured after ZBP-89 siRNA and scramble transfection in SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) which was not modified after specific siRNAs transfection. $\Delta Ct \text{ GUSB} = Ct_{(\text{GUSB in non-treated cells})} - Ct_{(\text{GUSB in siRNA transfected cells})}$.

Treatments were performed in triplicate (6-well plates). Each bar shows the mean \pm SD of three replicates for every experimental condition and the images are representative of three independent experiments.

AU: Arbitrary Units. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with non-treated cells (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

Figure 4. ZBP-89 binds to 5'UTR region of *ADORA2A* in SH-SY5Y cells. (A) Nineteen ZBP-89 binding sites predicted by MatInspector software are indicated as stars in the same diagram described in Fig. 2A. The sequences and positions of every ZBP-89 binding site are found in Table 3. (B) Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out in SH-SY5Y cells with a rabbit polyclonal ZBP89 antibody (black bars), a rabbit serum as a negative control of immunoprecipitation (IgG, white bars) and magnetic beads (gray bars) as negative control of the commercial kit used (see Material

and Methods section). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using a set of primers that amplified four loci covering the analysis of at least seven ZBP-89 binding sites (Table 4). Those ZBP-89 binding sites with a positive ChIP analyses are indicated as black stars in section A. **(C)** A parallel PCR analysis covering gastrin gene promoter was performed as positive control of ZBP-89 ChIP. Input refers to DNA chromatin not immunoprecipitated with the specific antibody. ChIP refers to DNA chromatin immunoprecipitated with the specific antibody. % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of nine samples from three independent ChIP assays. Dissociation curve analysis for every PCR product is shown as Supplemental Data 3.

Figure 5. YY1 represses basal *ADORA2A* expression in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells. **(A)** Seven YY1 binding sites predicted by MatInspector software are indicated as squares in the same diagram described in Fig. 2A. The sequences and positions of every YY1 binding site are found in Table 5. **(B)** SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M retinoic acid (RA) for 48 hours. Then RNA was extracted and $A_{2A}R$ mRNA levels were measured by TaqMan PCR. RA reduces the endogenous $A_{2A}R$ mRNA levels. DMSO was the vehicle used to dissolve RA. **(C)** The panel summarizes the procedure employed in this set of experiments. DiV: days *in vitro*. **(D)** RA-treated SH-SY5Y cells were transfected with a specific YY1 siRNA and a random siRNA (scramble: sc) as described in Material and Methods section. YY1 protein levels (65 kDa) were analyzed by Western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. **(E)** $A_{2A}R$ and YY1 mRNA levels were measured after YY1 siRNA and scramble transfection in RA-treated SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. **(F)** The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) which was not modified after specific siRNAs

transfection. $\Delta Ct \text{ GUSB} = Ct_{(\text{GUSB in non-treated cells})} - Ct_{(\text{GUSB in siRNA transfected cells})}$. **(G)** RA-treated SH-SY5Y cells were transfected with the pCMV/HA-YY1 vector as described in Material and Methods section. YY1 protein levels (65 kDa) were analyzed by Western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. The YY1 overexpressed presented additional 12 kDa which corresponded to HA tag incorporated in the expression vector. **(H)** $A_{2A}R$ mRNA levels were measured after YY1 overexpression in RA-treated SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. **(I)** The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) which was not modified after YY1 overexpression. $\Delta Ct \text{ GUSB} = Ct_{(\text{GUSB in non-treated cells})} - Ct_{(\text{GUSB in YY1 overexpressed cells})}$.

Figure 6. YY1 binds to 5'UTR region of *ADORA2A* in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells. **(A)** Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells with a rabbit polyclonal YY1 antibody (black bars) and a rabbit serum as a negative control (IgG, white bars) as described in Material and Methods section. Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using a set of primers that amplified four loci covering the analysis of seven predicted YY1 binding sites (see Fig. 5A). The sequence and position of oligos used in the ChIP analysis are shown in Table 6. **(B)** A parallel PCR analysis covering *c-fos* gene promoter was performed as positive control of YY1 ChIP. Input refers to DNA chromatin not immunoprecipitated with the specific antibody. ChIP refers to DNA chromatin immunoprecipitated with the specific antibody. % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of nine samples from three independent ChIP assays. Dissociation curve analysis for every PCR product is shown as Supplemental Data 4.

Figure 7. YY1 expression levels, but not ZBP-89, are increased in the putamen of PD patients. (A) Striatal ZBP-89 and (B) YY1 protein levels from total homogenates of patients with PD and age-matched controls were detected by Western blot. The detection of ZBP-89 showed the typical double band around 115 kDa, previously described for this transcription factor (Merchant et al., 1996). β -Actin (45 kDa) is blotted to control protein loading. The information for each patient number is found in Table 1. Densitometric analysis for every blot (mean \pm SD) is shown below every image. (C) Striatal YY1 mRNA levels in patients with PD and age-matched controls were analyzed by TaqMan PCR and normalized with β -glucuronidase (GUSB). The graph only represents the mean \pm SD of those cases shown in Table 1 with a RIN>7. More information about PCR reaction is found in Supplemental data 1 and in Material and Methods section.

AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. * p <0.05 compared with age-matched control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

Figure 8. Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy reveal nuclear localization of YY1 in positive $A_{2A}R$ neurons in the putamen of PD. Striatal positive $A_{2A}R$ (green) neurons present nuclear localization of YY1 (red) in PD (A-F). These changes are specific as no immunoreaction is obtained following incubation with the secondary antibodies alone (G-I). Nuclei are visualized in blue with TO-PRO iodide. All striatal samples are listed in Table 1. Bar = 20 microns.

Figure 9. Hypothetical model to depict the molecular mechanisms that play a role in (A) basal striatal $A_{2A}R$ s levels and in (B) increased striatal $A_{2A}R$ s levels found in PD.

AC: adenylate cyclase.

Supplemental Data 1. (A) The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) and its mRNA levels were not modified between control and PD cases. $\Delta\text{Ct GUSB} = \text{Ct}_{(\text{GUSB in control samples})} - \text{Ct}_{(\text{GUSB in PD samples})}$. **(B)** Representative standard curves for A_{2A}R, YY1 and GUSB constructed from several concentrations of a striatal PD sample. Ct values (y-axis) vs log of several RNA concentrations (x-axis) show a reverse linear correlation.

Supplemental Data 2. DNA methylation analysis of two non-CpG island regions.

(A) The two loci analyzed were covered by PCR 4 and PCR 5. Both sequences studied are indicated in the same diagram described in Fig. 2A. **(B)** DNA methylation percentage of both non-CpG island regions was analyzed in the same cases presented in Fig. 2. Graphs represent the percentage of DNA methylation (mean \pm SD) of each CpG site located in the locus amplified by PCR 4 and PCR 5 whose positions are indicated in Table 2.

C: control; PD: Parkinson's disease. There are no statistically significant differences among all the cases tested (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

Supplemental Data 3. Dissociation curve analysis for every PCR performed in the analysis of ZBP-89 ChIP and shown in Fig. 4. NTC: non-template control to rule out the formation of dimer primers.

Supplemental Data 4. Dissociation curve analysis for every PCR performed in the analysis of YY1 ChIP and shown in Fig. 6. NTC: non-template control to rule out the formation of dimer primers.

Table 1. Summary of the main clinical and neuropathological findings

C: Control, PD: Parkinson's disease. M: male, F: female. P-m delay: post-mortem delay in hours. PD Braak stages referred to Lewy body pathology (Braak et al., 2003). RIN: RNA integrity number

Number case	Disease	Gender	Age	P-m delay	PD Braak stages	RIN
1	C	M	39	3.30	0	6
2	C	M	43	6	0	7,4
3	C	F	46	9.35	0	-
4	C	M	56	5	0	7,5
5	C	M	56	3.50	0	6,8
6	C	M	59	6.25	0	2,8
7	C	M	59	7	0	7
8	C	M	61	2.45	0	7,1
9	C	F	66	8	0	7,3
10	C	M	67	5	0	7,3
11	C	F	69	2.30	0	2,2
12	C	F	73	7	0	7
13	C	F	78	3.40	0	-
14	C	F	81	4	0	7,3
15	C	F	77	3.30	0	-
16	PD	M	53	7.25	3	5,6
17	PD	M	57	11	3	7,2
18	PD	F	70	4.30	4	8,1
19	PD	F	70	5.15	4	-

20	PD	M	71	5.30	3	7,8
21	PD	F	78	27.30	3-4	6,7
22	PD	M	78	10.45	3	6,3
23	PD	F	79	3.30	3-4	5,5
24	PD	M	79	9.15	4	5,4
25	PD	M	83	4	4	6,4
26	PD	M	85	3.15	4	6,3
27	PD	M	76	12.30	3-4	5,9

Table 2. PCRs carried out in 5' UTR regions of *ADORA2A* to analyze the percentage of DNA methylation

	Localization in human genomic contig NT_011520	Position with respect to ATG site (exon 2) [#]	Sequence length (bp)*	Annealing temperature (°C)
PCR 1	4209874-4210419	- 10069 / - 9524	546	60
PCR 2	4210970-4211473	- 8973 / - 8470	504	62
PCR 3	4212060-4212568	- 7883 / -7375	509	62
PCR 4	4213300-4213802	- 6643 / -6141	503	60
PCR 5	4214642-4215133	- 5301 / - 4810	492	62

[#]Human *ADORA2A* mRNA (GenBank number NM_000675) was aligned with human genomic sequence, establishing that ATG is located at position 4219943 (contig GenBank number NT_011520).

*The PCR product length contains an additional 41 bp corresponding to the tag length incorporated in every forward and reverse primer (underlined sequences; see Material and Methods section).

Table 3. Information about the nineteen ZBP-89 binding sites predicted in 5'UTR region of *ADORA2A*

The 5'UTR *ADORA2A* was established by Yu et al. (2004). CpG sites are marked in bold and homology with ZBP-89 consensus sequence is indicated by underlining.

ZBP-89 binding site number (#)	ZBP-89 binding site sequence (5'→3') Consensus: gccCCTCCxCC	Genomic localization respect to ATG
#1	ca <u>cg</u> ccctctCCCCcacctgctc	- 1278 / - 1301
#2	ctcctc <u>ac</u> ctCCCCcaacctggc	- 4147 / - 4170
#3	tggcat <u>cc</u> ctCCCCcacagcc cg	- 5401 / - 5424
#4	gctccc <u>aca</u> CCCCcatgtgtcc	- 5579 / - 5602
#5	gggcca <u>ctca</u> CCCCctcaca cg a	- 5648 / - 5671
#6	tgagcag <u>c</u> ctCCCCcaggctggc	- 6175 / - 6198
#7	tctct <u>cacca</u> CCCCc cg ccaaca	- 6476 / - 6499
#8	ctccac <u>agca</u> CCCCcaccacaca	- 6988 / - 7011
#9	gtggg <u>cagca</u> CCCCcccccccc	- 8054 / - 8077
#10	cgcg ca <u>ccca</u> CCCCcatc cg tcc	- 8690 / - 8713
#11	cg gccc <u>cg</u> caCCCC cg a cg gccc	- 9331 / - 9354
#12	c cg ggcc <u>cca</u> CCCCcacactccc	- 9834 / - 9857
#13	acccttag <u>ct</u> CCCCcaactttag	- 10690 / - 10713
#14	gggaatt <u>ccc</u> CCCCcatcccccc	- 10961 / - 10984
#15	tggaggag <u>ct</u> CCCCctccaggtg	- 11730 / - 11753
#16	tgctgac <u>cca</u> CCCCctggcctca	- 12411 / - 12433
#17	acagggac <u>ct</u> CCCCcagccccac	- 12871 / - 12894
#18	ctgcc <u>cg</u> cctCCCCcacccccag	- 12914 / - 12936

#19	cgc <u>ccccctCCCC</u> ctgcctcac	- 14072 / - 14094
-----	---------------------------------	-------------------

Table 4. PCRs carried out in 5'UTR region of *ADORA2A* to analyze the ZBP-89 ChIP

ZBP-89 binding sites analyzed	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	PCR product length (bp)
#1	GTTCCGTACCTGCTTTCTGC	TGCCTCACCTCCCTCCTC	109
#2	GGCCTTGCTAGTGCGACATA	CTGCCTTCCTCCTCACCTC	104
#8.7.6	ATCAGGTGGAGAGAGGAGCA	AGCAGAGAAAATGCCCGAAG	105
#14.13	GGAGGATCAAGGCCACACT	GATGTGTCCCAATTTCCAA	110
Gastrin ^{&}	CCCTCACCATGAAGGTCAAC	ACCCTGCCATATGAGTCCAG	141

[&]Shiotani A and Merchant JL, 1995

Table 5. Information about the seven YY1 binding sites predicted in in 5'UTR region of *ADORA2A*

The 5'UTR *ADORA2A* was established by Yu and coworkers (2004). CpG sites are marked in bold and homology with YY1 consensus sequence is indicated by underlining.

YY1 binding site number (#)	YY1 binding site sequence (5'→3') Consensus: (C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)	Genomic localization respect to ATG
#1	ctgaaCCATctgcagaggg	- 318 / - 337
#2	aggggCCATcctcaggctg	- 448 / - 429
#3	gggagCCATtttaaactctg	- 1550 / - 1531
#4	ccctgCCATatgctcagat	- 4588 / - 4569
#5	gcc cg CCATctgagggagg	- 5921 / - 5902
#6	cg gggCCATctagaaacac	- 5975 / - 5956
#7	tccatCCATcttctgtctg	- 7069 / - 7088

Table 6. PCRs carried out in 5'UTR region of *ADORA2A* to analyze the YY1 ChIP

YY1 binding sites analyzed	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	PCR product length (bp)
#1.2	TGGCTATGACCACAGCAGAC	TTTCAGATCCCACCCTACCC	100
#3	GTTCCGTACCTGCTTTCTGC	TGCCTCACCTCCCTCCTC	109
#4	GGCCTTGCTAGTGCGACATA	CTGCCTTCCTCCTCACCTC	104
#5.6.7	ATCAGGTGGAGAGAGGAGCA	AGCAGAGAAAATGCCCGAAG	105

c-fos oligos were provided by the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode).

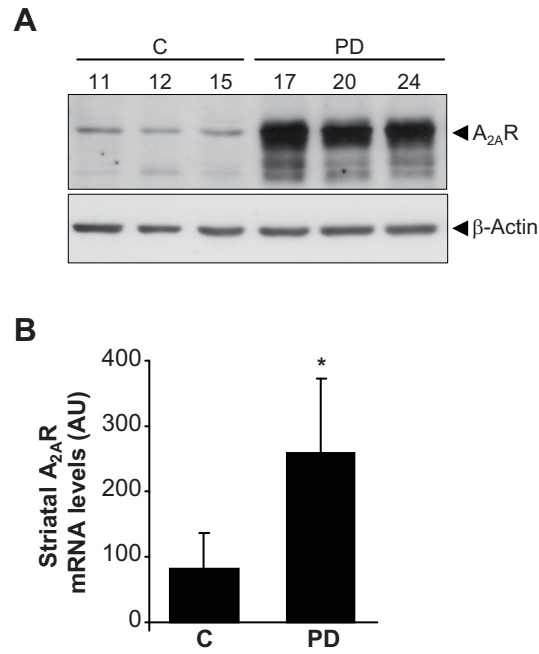


Figure 1. Increased A2AR levels are found in the putamen of Parkinson's disease patients. (A) Striatal A2AR protein levels (45 kDa) from plasma membrane extracts were detected by Western Blot. β -Actin (45 kDa) is blotted to control protein loading. The information for each patient number is found in Table 1 and the image is representative of all the human cases analyzed. **(B)** Striatal A2AR mRNA levels from total homogenates were analyzed by TaqMan PCR and normalized with β -glucuronidase (GUSB). The graph only represents the mean \pm SD of those cases shown in Table 1 with a RNA integrity number (RIN) > 7 (Ferrer et al., 2008). More information about PCR reaction is found in Supplemental data 1 and in Material and Methods section.

AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. * p <0.05 compared with control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

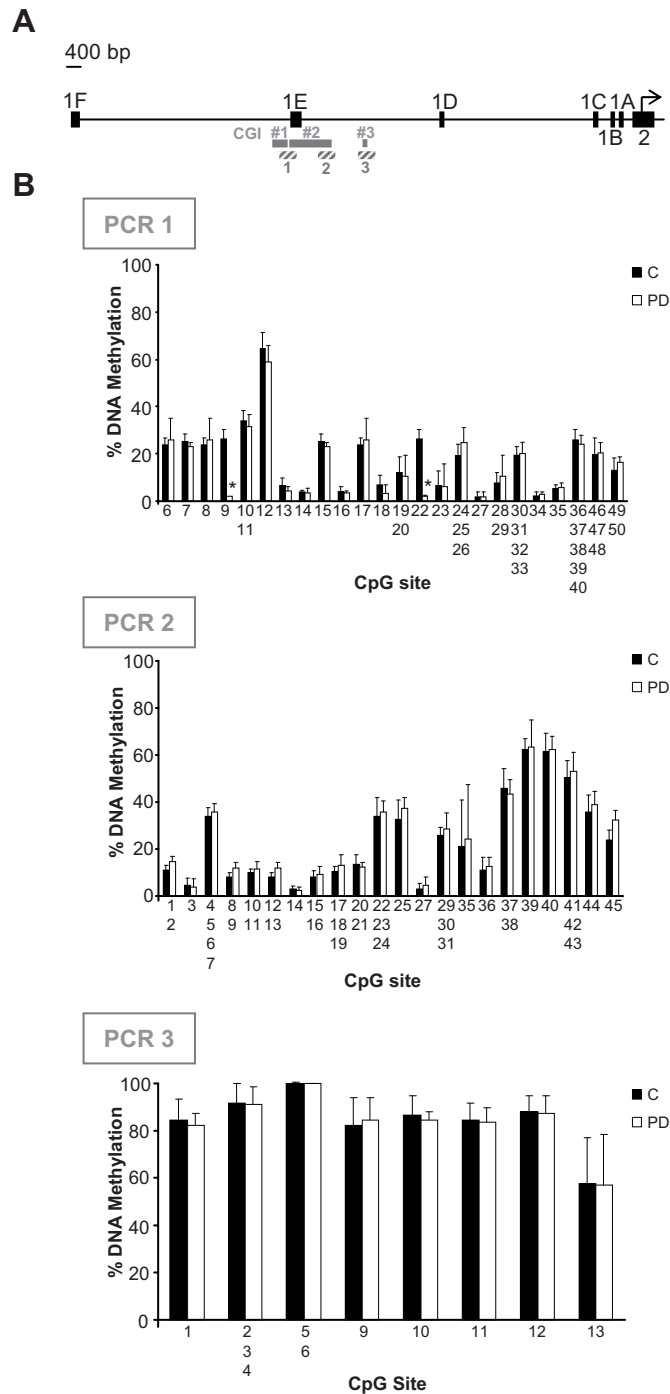


Figure 2. The percentage of DNA methylation in three predicted CpG islands located in 5'UTR region of *ADORA2A* is not modified in Parkinson's disease patients. (A) Scaled representation of 5' UTR region of human *ADORA2A* gene established by Yu and coworkers (2004) who identified 6 isoforms of non-coding exon 1 (1A-1F). Three putative CpG islands surrounding exon 1E were predicted by MethPrimer software and are drawn in the diagram as CGI#1-3 (Buirra et al., In press). The translational start site (ATG) is indicated with an arrow. The three loci analyzed were covered by PCR 1-3 which are indicated as dotted line. **(B)** DNA methylation percentage of three loci amplified by PCR 1-3 in the human post-mortem putamen of patients with Parkinson's disease (PD, n=7) with respect to control samples (C, n=13). The information for every human case analyzed is found in Table 1. Graphs represent the percentage of DNA methylation (mean \pm SD) of each CpG site located in every locus amplified by PCR (see Material and Methods section and Table 2). CpG site number 14 in PCR1 and CpG sites 28-30 in PCR2 contain ZBP-89 binding sites #12 and 10, respectively. $p < 0.001$ compared with control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

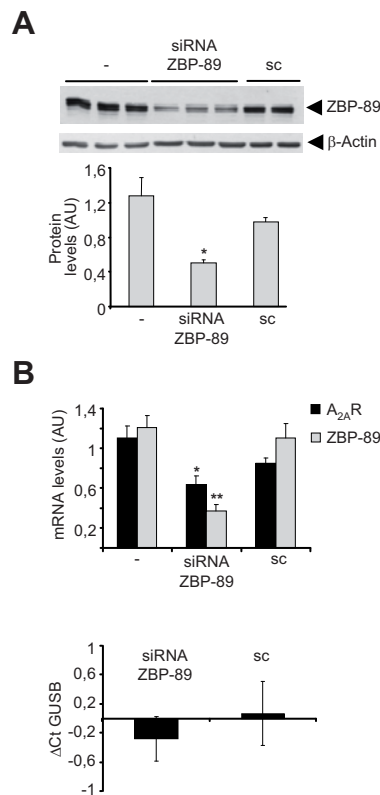


Figure 3. ZBP-89 is an activator of basal *ADORA2A* expression. (A) SH-SY5Y cells were transfected with a specific ZBP-89 siRNA and a random siRNA (scramble: sc) as described in Material and Methods section. ZBP-89 protein levels (115 kDa) were analyzed by Western blot, using b-actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. (B) A_{2A}R and ZBP-89 mRNA levels are measured after ZBP-89 siRNA and scramble transfection in SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. The endogenous control used for *real time* PCR was b-glucuronidase (GUSB) which was not modified after specific siRNAs transfection. $\Delta\text{Ct GUSB} = \text{Ct}(\text{GUSB in non-treated cells}) - \text{Ct}(\text{GUSB in siRNA transfected cells})$.

Treatments were performed in triplicate (6-well plates). Each bar shows the mean \pm SD of three replicates for every experimental condition and the images are representative of three independent experiments.

AU: Arbitrary Units. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ compared with non-treated cells (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

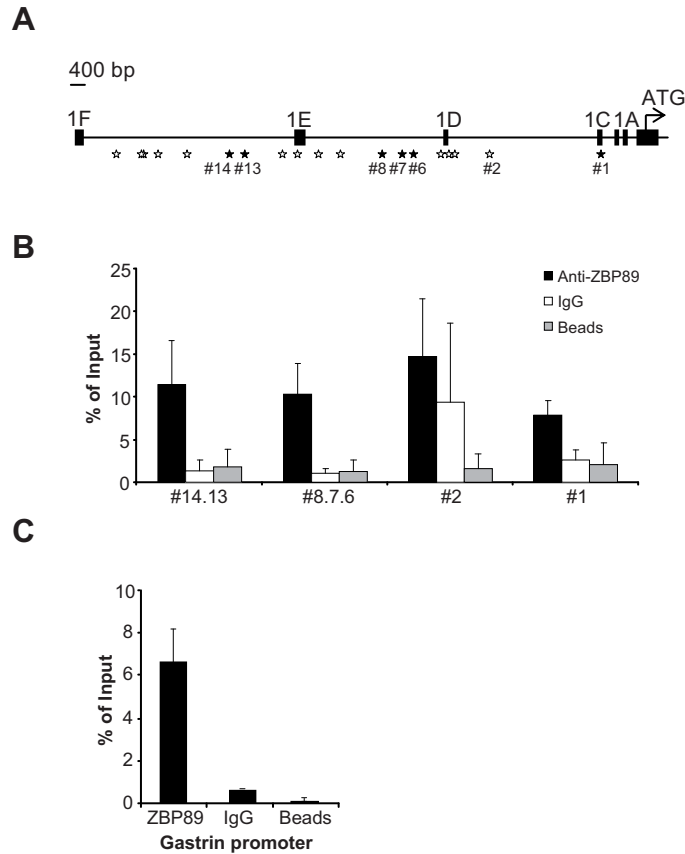


Figure 4. ZBP-89 binds to 5'UTR region of *ADORA2A* in SH-SY5Y cells. (A) Nineteen ZBP-89 binding sites predicted by MatInspector software are indicated as stars in the same diagram described in Fig. 2A. The sequences and positions of every ZBP-89 binding site are found in Table 3. **(B)** Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out in SH-SY5Y cells with a rabbit polyclonal ZBP89 antibody (black bars), a rabbit serum as a negative control of immunoprecipitation (IgG, white bars) and magnetic beads (gray bars) as negative control of the commercial kit used (see Material and Methods section). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using a set of primers that amplified four loci covering the analysis of at least seven ZBP-89 binding sites (Table 4). Those ZBP-89 binding sites with a positive ChIP analyses are indicated as black stars in section A. **(C)** A parallel PCR analysis covering gastrin gene promoter was performed as positive control of ZBP-89 ChIP. Input refers to DNA chromatin not immunoprecipitated with the specific antibody. ChIP refers to DNA chromatin immunoprecipitated with the specific antibody. % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of nine samples from three independent ChIP assays. Dissociation curve analysis for every PCR product is shown as Supplemental Data 3.

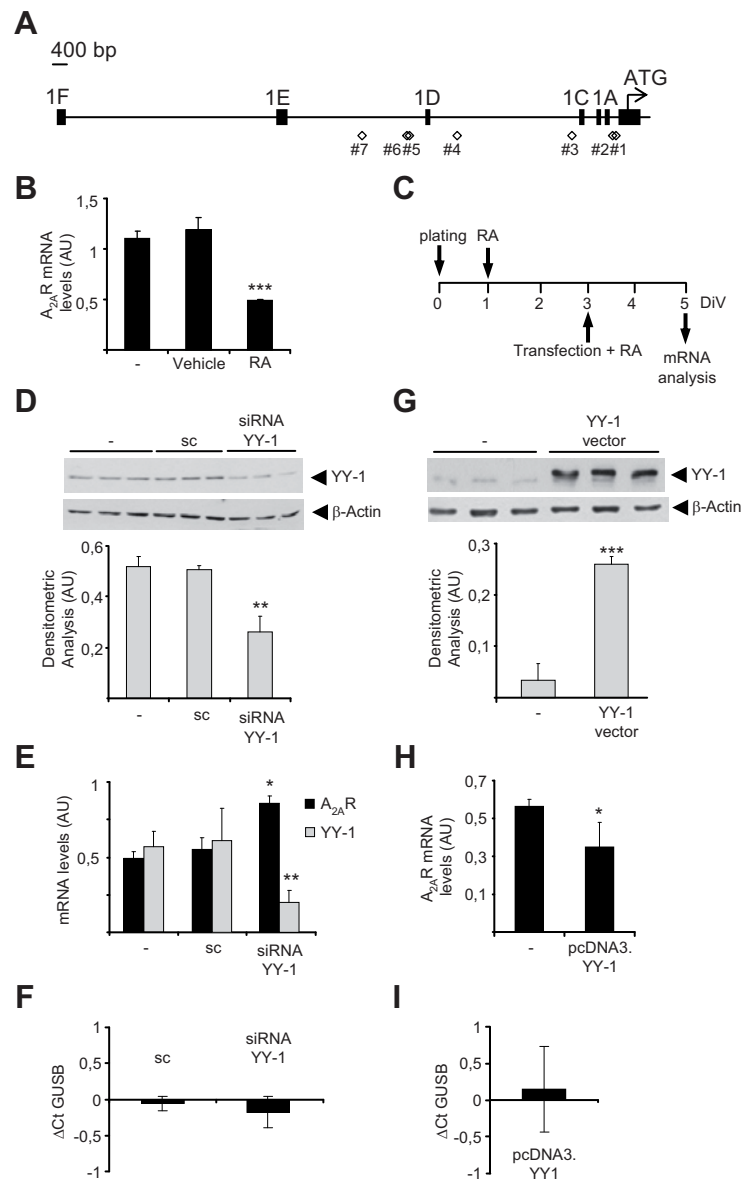


Figure 5. YY1 represses basal *ADORA2A* expression in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells. (A) Seven YY1 binding sites predicted by MatInspector software are indicated as squares in the same diagram described in Fig. 2A. The sequences and positions of every YY1 binding site are found in Table 5. (B) SH-SY5Y cells were treated with 10 μ M retinoic acid (RA) for 48 hours. Then RNA was extracted and A2AR mRNA levels were measured by TaqMan PCR. RA reduces the endogenous A2AR mRNA levels. DMSO was the vehicle used to dissolve RA. (C) The panel summarizes the procedure employed in this set of experiments. DiV: days *in vitro*. (D) RA-treated SH-SY5Y cells were transfected with a specific YY1 siRNA and a random siRNA (scramble: sc) as described in Material and Methods section. YY1 protein levels (65 kDa) were analyzed by Western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. (E) A2AR and YY1 mRNA levels were measured after YY1 siRNA and scramble transfection in RA-treated SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. (F) The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) which was not modified after specific siRNAs transfection. Δ Ct GUSB = Ct(GUSB in non-treated cells) – Ct(GUSB in siRNA transfected cells). (G) RA-treated SH-SY5Y cells were transfected with the pCMV/HA-YY1 vector as described in Material and Methods section. YY1 protein levels (65 kDa) were analyzed by Western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the blots. The YY1 overexpressed presented additional 12 kDa which corresponded to HA tag incorporated in the expression vector. (H) A2AR mRNA levels were measured after YY1 overexpression in RA-treated SH-SY5Y cells by TaqMan PCR. (I) The endogenous control used for *real time* PCR was β -glucuronidase (GUSB) which was not modified after YY1 overexpression. Δ Ct GUSB = Ct(GUSB in non-treated cells) – Ct(GUSB in YY1 overexpressed cells).

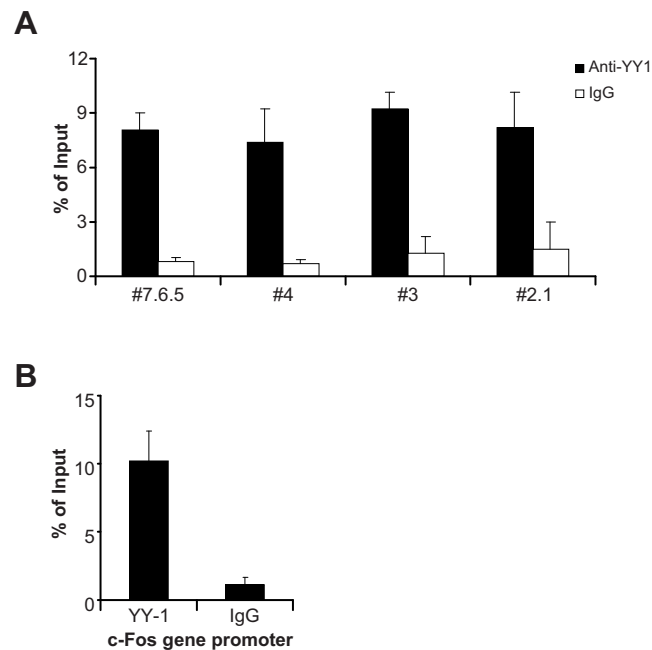


Figure 6. YY1 binds to 5'UTR region of *ADORA2A* in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells. (A) Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was carried out in retinoic acid-treated SH-SY5Y cells with a rabbit polyclonal YY1 antibody (black bars) and a rabbit serum as a negative control (IgG, white bars) as described in Material and Methods section. Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using a set of primers that amplified four loci covering the analysis of seven predicted YY1 binding sites (see Fig. 5A). The sequence and position of oligos used in the ChIP analysis are shown in Table 6. (B) A parallel PCR analysis covering *c-fos* gene promoter was performed as positive control of YY1 ChIP. Input refers to DNA chromatin not immunoprecipitated with the specific antibody. ChIP refers to DNA chromatin immunoprecipitated with the specific antibody. % of input represents the percentage of ChIP/Input ratio. The graph bars show the mean \pm SD of nine samples from three independent ChIP assays. Dissociation curve analysis for every PCR product is shown as Supplemental Data 4.

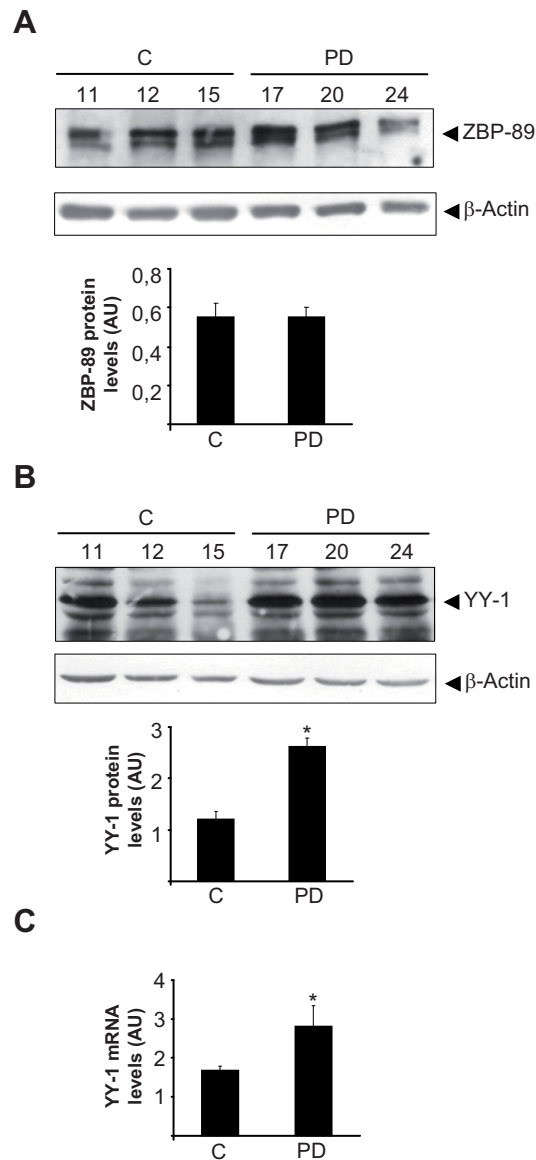


Figure 7. YY1 expression levels, but not ZBP-89, are increased in the putamen of PD patients. (A) Striatal ZBP-89 and (B) YY1 protein levels from total homogenates of patients with PD and age-matched controls were detected by Western blot. The detection of ZBP-89 showed the typical double band around 115 kDa, previously described for this transcription factor (Merchant et al., 1996). β -Actin (45 kDa) is blotted to control protein loading. The information for each patient number is found in Table 1. Densitometric analysis for every blot (mean \pm SD) is shown below every image. (C) Striatal YY1 mRNA levels in patients with PD and age-matched controls were analyzed by TaqMan PCR and normalized with β -glucuronidase (GUSB). The graph only represents the mean \pm SD of those cases shown in Table 1 with a RIN>7. More information about PCR reaction is found in Supplemental data 1 and in Material and Methods section.

AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. * p <0.05 compared with age-matched control samples (ANOVA with post-hoc Scheffe test).

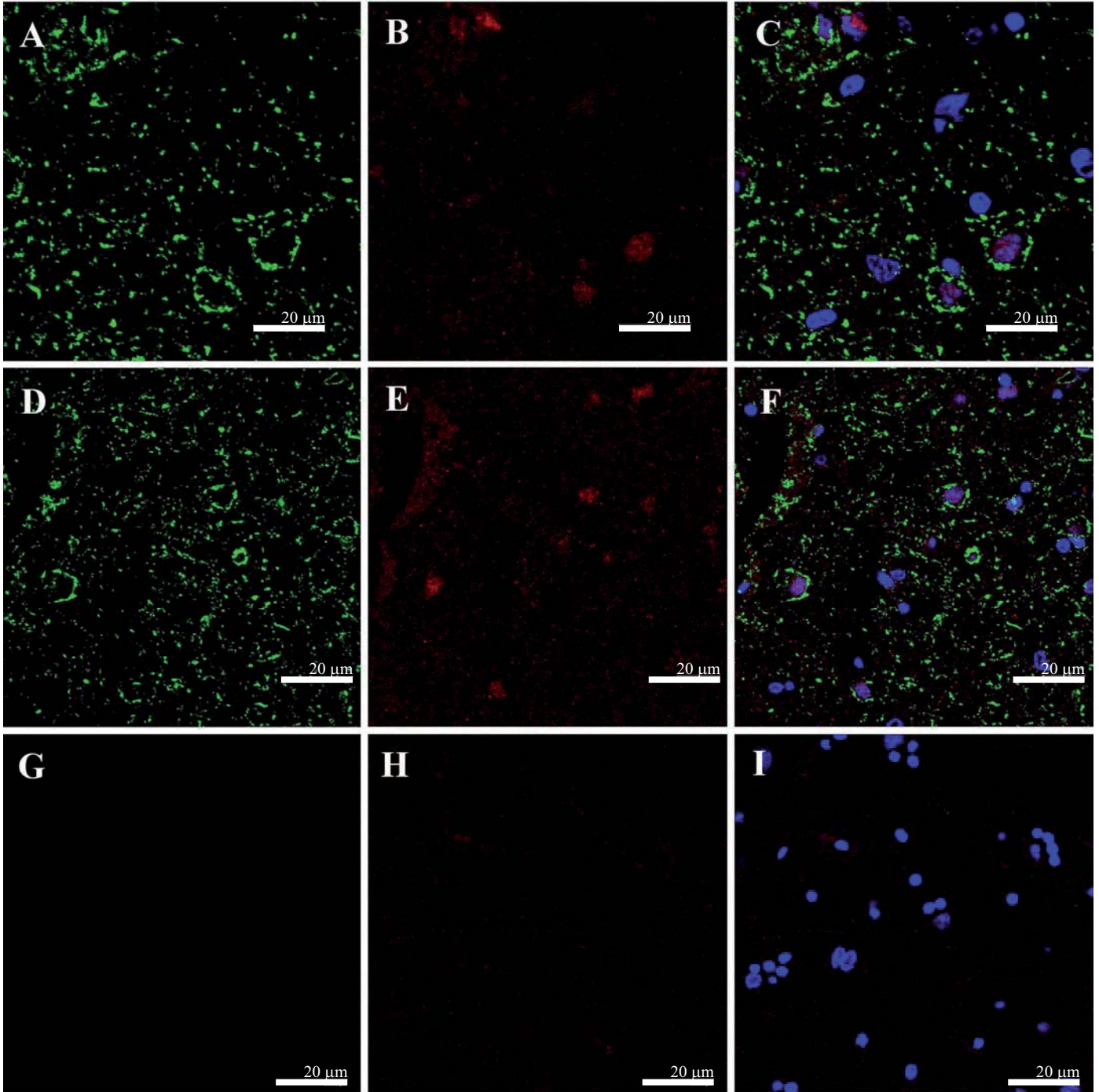


Figure 8. Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy reveal nuclear localization of YY1 in positive A2AR neurons in the putamen of PD. Striatal positive A2AR (green) neurons present nuclear localization of YY1 (red) in PD (A-F). These changes are specific as no immunoreaction is obtained following incubation with the secondary antibodies alone (G-I). Nuclei are visualized in blue with TO-PRO iodide. All striatal samples are listed in Table 1. Bar = 20 microns.

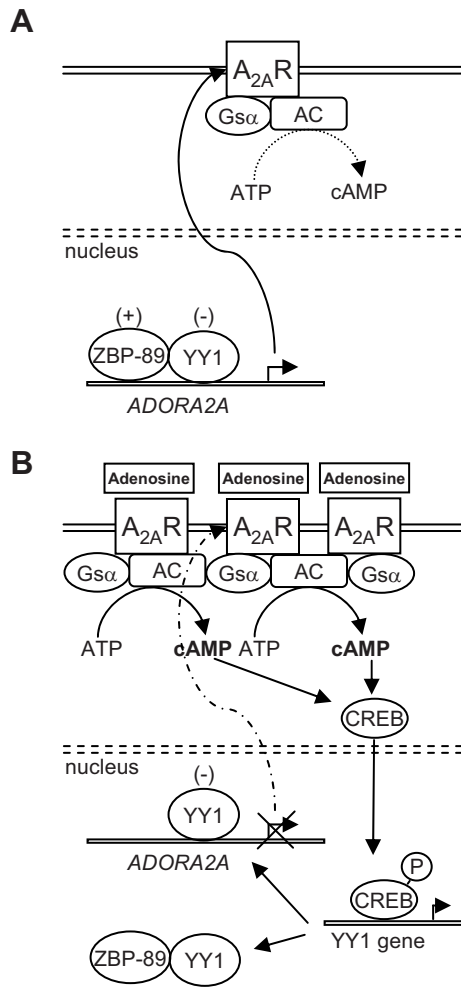
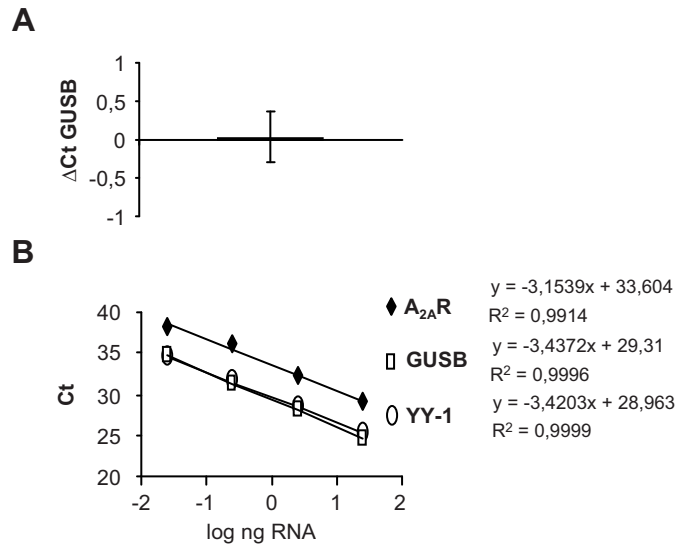
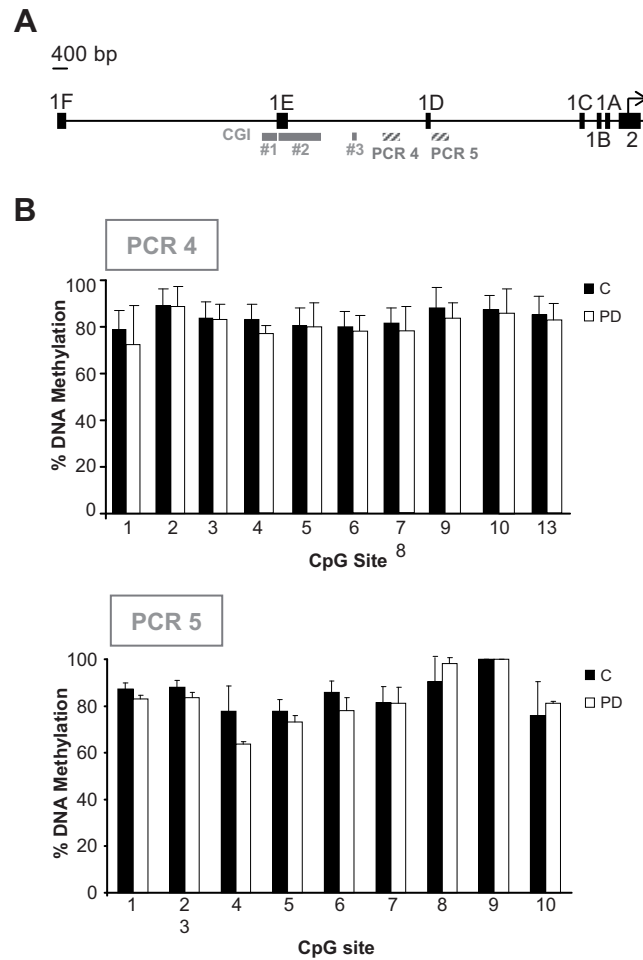


Figure 9. Hypothetical model to depict the molecular mechanisms that play a role in (A) basal striatal A2ARs levels and in (B) increased striatal A2ARs levels found in PD.

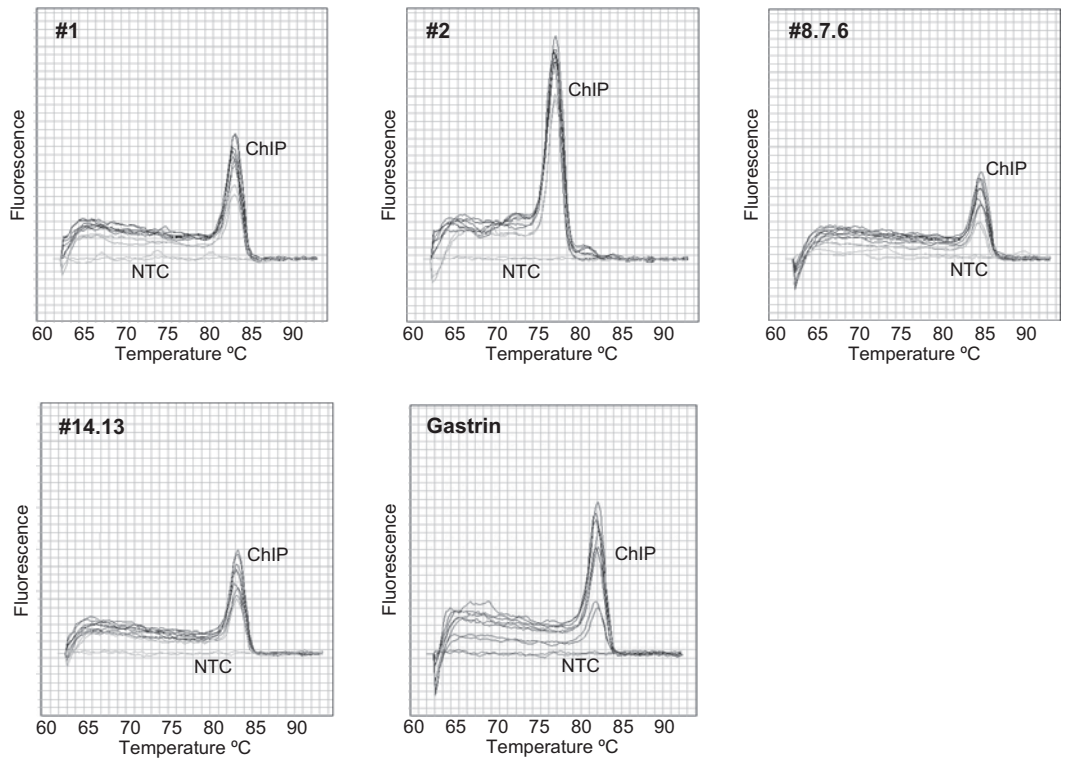
AC: adenylate cyclase.



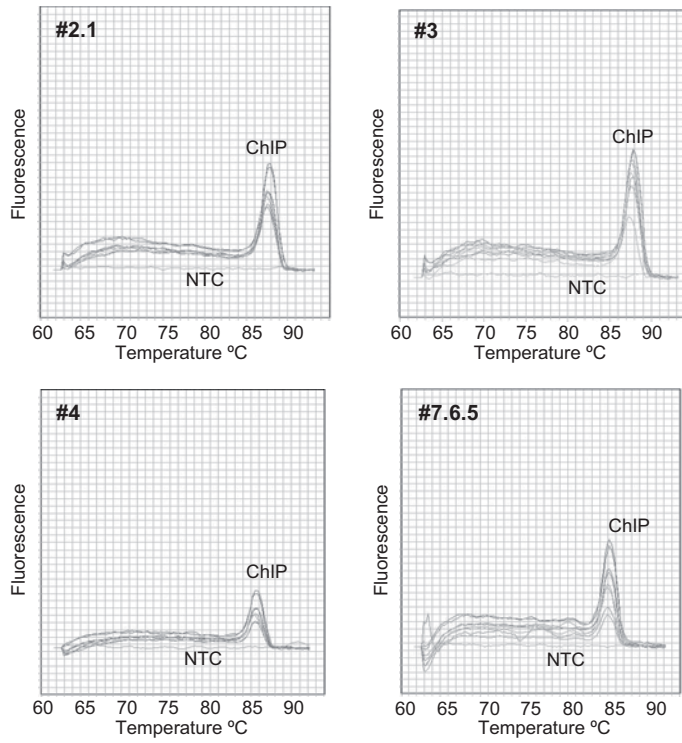
Supplemental Data 1. (A) The endogenous control used for *real time* PCR was b-glucuronidase (GUSB) and its mRNA levels were not modified between control and PD cases. $\Delta Ct \text{ GUSB} = Ct(\text{GUSB in control samples}) - Ct(\text{GUSB in PD samples})$. (B) Representative standard curves for A2AR, YY1 and GUSB constructed from several concentrations of a striatal PD sample. Ct values (y-axis) vs log of several RNA concentrations (x-axis) show a reverse linear correlation.



Supplemental Data 2. DNA methylation analysis of two non-CpG island regions. (A) The two loci analyzed were covered by PCR 4 and PCR 5. Both sequences studied are indicated in the same diagram described in Fig. 2A. **(B)** DNA methylation percentage of both non-CpG island regions was analyzed in the same cases presented in Fig. 2. Graphs represent the percentage of DNA methylation (mean \pm SD) of each CpG site located in the locus amplified by PCR 4 and PCR 5 whose positions are indicated in Table 2. C: control; PD: Parkinson's disease. There are no statistically significant differences among all the cases tested (ANOVA with post-hoc Scheffe test).



Supplemental Data 3. Dissociation curve analysis for every PCR performed in the analysis of ZBP-89 ChIP and shown in Fig. 4. NTC: non-template control to rule out the formation of dimer primers.



Supplemental Data 4. Dissociation curve analysis for every PCR performed in the analysis of YY1 ChIP and shown in Fig. 6. NTC: non-template control to rule out the formation of dimer primers.