

RESUM EN CATALÀ

INTRODUCCIÓ

Els receptors de set dominis transmembrana o acoblats a proteïna G (*G-protein coupled receptors* o GPCRs) formen una de les famílies de proteïnes més importants en vertebrats, s'estima que constitueixen més d'un 1% del genoma, i els seus lligands presenten una gran diversitat química, des d'amines biogèniques, pèptids, glicoproteïnes, lípids, nucleòtids, ions a, fins i tot, proteases.

Malgrat la diversitat existent, tots els GPCRs són proteïnes integrals de membrana amb una estructura tridimensional similar. Aquests receptors contenen set dominis transmembrana hidrofòbics en conformació d'hèlix- α units per tres bucles intracel·lulars i tres d'extracel·lulars, amb l'extrem N-terminal situat a la cara extracel·lular de la membrana i l'extrem C-terminal en el costat citoplasmàtic d'aquesta. Una segona característica important que comparteixen tots els GPCRs és la seva habilitat per interaccionar amb les proteïnes G, proteïnes heterotrimèriques ($\alpha\beta\gamma$) que actuen com a intercanviadors de nucleòtids de guanina. Un cop el lligand interacciona amb el seu GPCR, les subunitats α i $\beta\gamma$ modulen diverses vies de transducció de senyal dins la cèl·lula.

Dins de la gran família dels receptors acoblats a proteïnes G, aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi dels receptors de dopamina i dels receptors d'adenosina, concretament dels subtipus D_2 i A_{2A} i A_1 respectivament.

La dopamina és un neurotransmissor que exerceix el seu efecte actuant sobre els seus receptors específics situats a la membrana cel·lular. Els receptors de dopamina es classifiquen en funció de les seves propietats moleculars, bioquímiques i farmacològiques, en dues famílies: la família D_1 -like conté els receptors D_1 i D_5 que es caracteritzen pel seu acoblament a proteïnes del tipus G_s (activadores, entre d'altres, de l'enzim adenilat ciclasa); la família D_2 -like conté els receptors D_2 , D_3 i D_4 , els quals s'acoblen a proteïnes del tipus $G_{i/o}$ (les quals inhibeixen l'adenilat ciclasa i activen altres vies com la de PLC o inhibeixen els corrents de Ca^{2+}).

Dins de la família dels receptors de dopamina, els receptor del tipus D_2 han estat objecte d'un gran nombre d'estudis degut a la seva participació en moltes funcions fisiològiques de gran importància com són la síntesi i alliberament d'hormones pituitàries o el control de l'activitat motora. A més, els receptors D_2 de dopamina estan implicats en diversos estats neuropatològics com la malaltia de Parkinson o la drogaaddicció i representen la principal diana de drogues antipsicòtiques.

El receptor D_2 de dopamina es troba principalment al sistema nerviós central, concretament al tubercle olfactori, caudat-putamen i al nucli accumbens on s'expressa en neurones GABAèrgiques que coexpressen encefalina. Tot i així, encara que en menor quantitat, també es troba mRNA d'aquest receptor fora d'aquestes zones, com la substància nigra, l'àrea tegmental ventral i, fins i tot en el sistema nerviós perifèric.

La principal via de transducció de senyal descrita per als receptors D_2 de dopamina és la mitjançada per la inhibició de l'enzim adenilat ciclasa a través de la subunitat α_i de les proteïnes del tipus $G_{i/o}$. Tot i així, també s'han definit vies de

senyalització independents dels nivells d'AMPc, com ara la inhibició dels corrents de Ca^{2+} o l'activació de la PLC.

A diferència de la dopamina, que és un neurotransmissor clàssic, l'adenosina és un neuromodulador. L'adenosina és un nucleòsid format estructuralment per la base purínica adenina i una ribosa. Tant l'adenosina com els seus derivats tenen un paper important en el funcionament cel·lular ja que, a més de ser intermediaris de rutes metabòliques, actuen, fonamentalment en forma d'ATP, com a font principal d'energia per a la cèl·lula.

Malgrat el seu paper en el metabolisme cel·lular, l'adenosina també pot exercir una funció reguladora actuant a través dels seus receptors específics situats a la membrana cel·lular. Es coneixen quatre subtipus de receptors, A_1 , A_{2A} , A_{2B} i A_3 , classificats així en funció de les seves característiques moleculars, bioquímiques i farmacològiques. De fet, mentre els subtipus A_1 i A_3 s'acoblen principalment a proteïnes del tipus G_i , els receptors dels subtipus A_{2A} i A_{2B} ho fan a proteïnes G_s , tenint així com a principal via de senyalització l'activació de l'adenilat ciclasa.

L'acció de l'adenosina a través dels seus receptors específics desenvolupa papers importants en la modulació de moltes funcions cel·lulars. Així, per exemple, s'ha observat que els receptors d'adenosina participen en la inhibició de l'agregació plaquetària, la regulació de la pressió sanguínia o la permeabilitat vascular. A més, s'ha demostrat també un paper important de l'adenosina com a neuromodulador en el sistema nerviós central i, també, com a substància protectora dels teixits en condicions d'isquemia.

Dels quatre subtipus de receptors d'adenosina, el subtipus A_{2A} ha esdevingut el centre d'una intensa recerca en el camp de la neurociència degut, principalment, a la seva relació amb patologies derivades de desordres en el moviment com ara la malaltia de Parkinson.

El receptor A_{2A} presenta una elevada expressió en estriat, nucli accumbens i tubercle olfactori. Tot i així, tècniques més sensibles han pogut detectar-ne l'expressió en altres zones del sistema nerviós i també de teixits perifèrics. La principal via de transducció de senyal del receptor A_{2A} d'adenosina deriva de l'activació de l'enzim adenilat ciclasa per part de la proteïna G_s , l'augment en els nivells d'AMPc activa la quinasa PKA, la qual alhora regula l'estat de fosforilació de gran varietat de proteïnes. Però, tal com s'ha esmentat en el cas dels receptors de dopamina, el receptor A_{2A} d'adenosina també activa altres vies independents d'AMPc, com PLC i MAPK.

Durant els darrers anys s'han anat acumulant resultats experimentals que indiquen que la neurotransmissió dopaminèrgica participa en els efectes motors dels derivats de l'adenosina. De fet, hi ha resultats morfològics i funcionals que suggereixen una interacció de tipus antagonístic entre els receptors de dopamina i els receptors d'adenosina, concretament entre els subtipus A_1 - D_1 i A_{2A} - D_2 . En primer lloc, s'ha demostrat una co-distribució entre aquestes parelles en diferents tipus de neurones. En el grup de recerca en el qual s'inclou aquesta Tesi es va caracteritzar la capacitat dels receptors A_1 d'adenosina i D_1 de dopamina per a

formar complexes heterodimerics en la membrana cel·lular. Aquesta interacció es creu que és en part responsable dels efectes antagonístics entre els receptors A_1 i D_1 . Per altra banda, pel que fa a la parella A_{2A}/D_2 els agonistes del receptor A_{2A} d'adenosina són capaços de contrarestar l'efecte dels agonistes de D_2 pel que fa a l'alliberament de GABA per les neurones GABAèrgiques estriopallidals. A nivell bioquímic, l'estimulació del receptor A_{2A} d'adenosina provoca un descens en l'afinitat per agonistes del receptor D_2 de dopamina i, finalment, a nivell de comportament, baixes dosis d'agonistes dels receptors d'adenosina contraresten les activitats motores induïdes per l'estimulació dels receptors de dopamina.

Així, com s'ha descrit al llarg d'aquesta introducció, l'adenosina, interaccionant amb els seus receptors específics, actua com a neuromodulador clau en la regulació de processos neurològics. L'adenosina també afecta la diferenciació neuronal i la proliferació, però els mecanismes d'aquests efectes i els receptors que hi són implicats encara han estat identificats. Prenent això com antecedents, aquesta Tesi doctoral s'han plantejat els següents objectius generals:

- Degut al paper de l'adenosina com a modulador de les accions de la dopamina en els ganglis basals, els receptors d'adenosina es proposen com a dianes terapèutiques en la malaltia de Parkinson. Per aquest fet, el primer objectiu general d'aquesta tesi ha estat caracteritzar la interacció molecular entre els receptors A_{2A} d'adenosina i els D_2 de dopamina així com aprofundir en el seu paper fisiològic.
- Actualment es postula que la dimerització és un estat freqüent per a molts GPCRs. Així, quan se'ls considera com a dianes terapèutiques, és important saber la seva habilitat per formar tan homo- com heterodimers. En aquest sentit el segon objectiu general ha sigut investigar la homodimerització dels receptors A_{2A} d'adenosina des d'una perspectiva estructural i funcional.
- Finalment, el tercer gran objectiu d'aquesta Tesi ha estat identificar quins receptors d'adenosina participen en la regulació dels processos de diferenciació neuronal així com els mecanismes cel·lulars implicats en aquests efectes.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

La primera part d'aquesta Tesi la constitueixen dos treballs de recerca en els que es demostra que els receptors A_{2A} d'adenosina ($A_{2A}R$) i els D_2 de dopamina (D_2R) formen heteromèrers:

*Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casadó, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M., Mallol, J., Canela, E.I., Zoli, M., Agnati, L., Ibañez, C., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S. and Fuxe, K., 2002, "Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A_{2A} receptor and dopamine D_2 receptors". *Journal of Biological Chemistry*, 20, 18091-18097.*

*Canals, M., Marcellino, D., Fanelli, F., Ciruela, F., Benedetti, P., Goldberg, S., Neve, K., Fuxe, K., Agnati, L., Woods, A., Ferré, S., Lluís, C., Bouvier, M. and Franco, R., 2003, "Adenosine A_{2A} -dopamine D_2 receptor-receptor heteromerization. Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer". *Journal of Biological Chemistry*, 47, 46741-46749.*

En el primer treball que es presenta, s'empra la línia cel·lular humana de neuroblastoma SH-SY5Y, transfectada de manera estable amb la isoforma llarga del receptor humà D_2 de dopamina. La caracterització prèvia d'aquesta línia per experiments d'unió de radiol·ligands mostra que s'expressen de manera constitutiva els receptors d'adenosina A_{2A} i A_1 , en quantitats de 200 i 100 fmol/mg de proteïna respectivament, i que els nivells d'expressió de D_2 transfectat arriben a 1100 fmol/mg prot (Salim et al., 2000). En aquestes cèl·lules els receptors A_{2A} i D_2 col·localitzen en la membrana cel·lular en cèl·lules en estat basal. En canvi, el tractament d'aquestes cèl·lules tant amb l'agonista d' $A_{2A}R$ (CGS21680), com amb el de D_2R (quinpirola), indueix l'agregació d'ambdós receptors. Aquest efecte, que es veu augmentat quan les cèl·lules es tracten amb tots dos agonistes simultàniament, és, a més, específic ja que quan cèl·lules parentals (que no expressen D_2R) es tracten amb quinpirola, no s'observa agregació dels receptors A_{2A} expressats de manera endògena.

Degut a que el tractament simultani amb tots dos agonistes, a més d'induir l'agregació dels receptors també disminueix la intensitat d'immunomarcatge a la membrana cel·lular, s'ha comprovat si el procés de coagregació és seguit per una internalització conjunta de tots dos receptors. Això es confirma en experiments on, en primer lloc, les cèl·lules transfectades s'incuben amb els anticossos a 4°C en presència o absència dels lligands i, posteriorment s'indueix la internalització per incubació amb els lligands a 37°C. Per microscopia confocal s'observen agregats d'ambdós receptors en compartiments intracel·lulars, indicant que els $A_{2A}R$ i D_2R coagreguen i cointernalitzen quan són activats pels seus lligands.

A nivell de l'acumulació d'AMPC, quan les cèl·lules es tracten, prèviament a la seva estimulació, amb CGS21680 o amb quinpirola, el receptor A_{2A} perd la capacitat d'induir augments en els nivells d'AMPC, resultat que demostra que aquest receptor experimenta una desensitització tan homologa (és a dir induïda

pel seu propi lligand), com heteròloga (induïda pel lligand de D₂R). En canvi, el receptor D₂ no experimenta aquesta desensitització ja que després de tots dos tractaments previs amb els lligands, encara mostra una capacitat significativa de reduir els nivells d'AMPc induïts per forskolina. Tot i així, quan les cèl·lules es preincuben amb els lligands de tots dos receptors alhora, la capacitat de D₂R a disminuir els nivells d'AMPc es veu significativament reduïda, resultat que sembla indicar que la coestimulació d'ambdós receptors accelera la desensitització del receptor D₂ probablement degut a una acceleració en la seva internalització.

La interacció entre els receptors A_{2A} d'adenosina i els receptors D₂ de dopamina s'ha demostrat amb experiments de co-immunoprecipitació en membranes de cèl·lules SH-SY5Y transfectades amb el receptor D₂. Així s'observa que la immunoprecipitació amb un anticòs dirigit contra A_{2A}R seguida d'un marcatge per western blot del receptor D₂, revela les bandes corresponents a aquest últim receptor, el que és indicatiu de que aquests dos receptors coimmunoprecipiten. La coimmunoprecipitació no s'observa quan l'anticòs immunoprecipitant és un irrellevant ni quan es revela amb un anticòs contra el receptor A₁ d'adenosina. Addicionalment, l'especificitat d'aquesta interacció es demostra en cèl·lules de fibroblasts de ratolí on, mentre s'observa co-immunoprecipitació entre A_{2A}R i D₂R, aquesta no és possible quan el receptor de dopamina és del tipus D₁.

La interacció entre A_{2A}R i D₂R s'ha estudiat també en cultius primaris de neurones d'estriat de rata. A nivell d'AMPc, en aquestes cèl·lules, es demostra la interacció antagonística entre A_{2A}R i D₂R ja que CGS21680 és capaç de contrarestar l'efecte del quinpirole com a inhibidor de la producció d'AMPc induïda per forskolina. A més, en aquests cultius neuronals, també s'observa un alt grau de col·localització entre ambdós receptors a nivell basal. El tractament amb els corresponents agonistes indueix, de manera similar, l'agregació dels dos receptors però, a diferència del que passava en la línia cel·lular de neuroblastoma, el tractament simultani amb tots dos agonistes no mostra sinergia d'agregació.

La tècnica de co-immunoprecipitació s'ha utilitzat de manera extensiva durant aquests últims anys per al descobriment i caracterització d'interaccions entre proteïnes. No obstant, per a determinar interaccions entre receptors de la membrana cel·lular, aquesta tècnica requereix processos de solubilització de les membranes, processos que poden resultar problemàtics quan es considera l'alt grau d'hidrofobicitat que tenen aquests receptors. Així doncs, tot i que hi ha evidències que validen aquesta tècnica en l'estudi d'interaccions entre receptors (Salim et al., 2002; Salahpour et al., 2003), no es poden descartar agregacions atrefactuals provocades en els processos de solubilització.

Recentment, el fenomen de dimerització dels receptors acoblats a proteïnes G s'ha pogut demostrar finalment en cèl·lules vives gràcies al desenvolupament de mètodes biofísics basats en la transferència d'energia. Aquestes tècniques es basen en la transferència d'energia entre dipols electromagnètics de dos fluoròfors. Concretament en la tècnica de FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), tant el donador com l'acceptor són molècules fluorescents, mentre que en BRET (*Bioluminescence resonance energy transfer*), el donador és una molècula bioluminiscent. Hi ha dos requisits per a que es produeixi un fenomen de

transferència d'energia. En primer lloc, hi ha d'haver solapament entre els espectres d'emissió del donador i el d'excitació de l'acceptor i, en segon lloc, que donador i acceptor estiguin a una distància suficientment curta, normalment menys de 100 Å. Aquesta dependència tan crítica de la distància és el que fa que aquestes dues tècniques s'utilitzin per a la monitorització d'interaccions entre proteïnes en cèl·lules vives. Així doncs, en els últims anys, les tècniques de BRET i FRET han permès la confirmació i el descobriment d'interaccions entre GPCRs (Angers et al., 2002).

En el segon treball d'aquesta Tesi s'ha fet ús d'aquestes tècniques per a l'aprofundiment en l'estudi de la interacció entre els receptors A_{2A} d'adenosina i D_2 de dopamina.

Per tal de poder aplicar les tècniques de FRET i BRET s'han obtingut les construccions corresponents a receptors A_{2A} o D_2 fusionats, en C-terminal, a les proteïnes fluorescents o bioluminiscent d'interès, és a dir, *YFP*, *GFP2* i *Rluc*. S'ha comprovat que aquestes construccions s'expressen correctament en la membrana cel·lular i que són funcionals, així, les proteïnes de fusió d' $A_{2A}R$ indueixen un augment en els nivells d'AMPC en presència de CGS21680 mentre que les construccions de D_2R en disminueixen aquests nivells induïts per forskolina.

S'han desenvolupat dues tècniques de FRET, mitjançant microscopia confocal s'han fet experiments de *pbFRET* (photobleaching FRET) i, posteriorment, aquests resultats s'han confirmat aplicant una variant d'aquesta tècnica en un fluorímetre. L'eficiència de FRET obtinguda en ambdues aproximacions és similar, al voltant d'un 25%, la qual aplicada a la corba teòrica que relaciona eficiència i distància entre fluorocroms, indica que la distància entre fluoròfors (*GFP2* i *YFP*), és aproximadament d'uns 6-6.5 nm.

La tècnica de BRET permet fer un anàlisi quantitatiu de les interaccions observades. De fet, el nivell de transferència d'energia ha d'augmentar en proporció a la quantitat d'acceptor existent fins que totes les molècules de donador hi són unides de manera que aleshores s'assoleix un nivell de saturació (Mercier et al., 2002) S'estableix que el nivell màxim de transferència d'energia depèn del nombre de dimers formats i de la distància relativa entre donador i acceptor i que la concentració d'acceptor que genera un 50% del senyal màxim ($BRET_{50}$) és indicativa de l'afinitat relativa per a la dimerització d'ambdues proteïnes. S'ha aplicat aquesta aproximació en l'estudi dels dimers $A_{2A}R/D_2R$. En cèl·lules co-transfectades amb nivells constants d' $A_{2A}R-Rluc$ i quantitats creixents de D_2R-YFP s'ha obtingut una corba de saturació indicativa de l'especificitat d'aquesta interacció, especificitat que s'ha confirmat amb l'observació que la parella $A_{2A}R-Rluc/GABA_B R2-YFP$ no genera un BRET detectable.

Recentment s'ha demostrat que el fenomen de transferència d'energia pot succeir entre molècules molt properes que no interaccionen físicament però que es localitzen en microdominis de la membrana plasmàtica que les mantenen a distàncies suficientment curtes (per exemple els anomenats *rafts*) (Zacharias et al., 2002). Per descartar aquesta possibilitat, s'ha utilitzat ciclodextrina- β per a disrompre aquestes estructures per empobriment en colesterol. Així, el senyal de BRET obtingut després del tractament amb ciclodextrina- β de cèl·lules

transfectades amb d'A_{2A}R-*Rluc* i D₂R-*YFP* no mostra cap variació respecte les cèl·lules no tractades, ni tampoc quan les cèl·lules recuperen els nivells de colesterol normals. Aquests resultats, doncs, demostren que la transferència d'energia obtinguda no és deguda a la presència dels dos receptors en microdominis de membrana, sinó a la formació de complexos heteromèrics.

Malgrat que la distribució subcel·lular d'A_{2A}R-*Rluc* i D₂R-*YFP* és principalment a la membrana plasmàtica, l'estimulació tant amb l'agonista d'A_{2A}R (CGS21680), com amb el de D₂R (quinpirole) o amb tots dos agonistes simultàniament no provoca canvis en el senyal de BRET. Aquest resultat indica, doncs, que l'activació d'aquest receptor no induïx canvis en l'estat d'oligomerització dels heteromèrics, no obstant no es pot descartar que, tal i com s'observa en les cèl·lules de neuroblastoma, l'estimulació per agonistes afavoreixi la redistribució o clusterització d'aquests dímers.

Per tal d'aprofundir en la caracterització de la interacció entre d'A_{2A}R i D₂R s'han realitzat models teòrics d'aquesta interacció. En col·laboració amb la Dra. Fanelli de la Universitat de Mòdena s'han fet estudis computacionals que han generat dos grups principals d'interaccions. L'anomenat *població 1* presenta un model en el que les hèlixs 5,6 i la part N-terminal del tercer *loop* intracel·lular de D₂R interaccionen amb l'hèlix4 i la cua C-terminal del receptor A_{2A}. Aquest model concorda amb els resultats obtinguts en experiments de competició de BRET en els quals, en cèl·lules transfectades amb A_{2A}R-*Rluc* i D₂R-*YFP*, la transfecció simultània del receptor D₂ natiu disminueix el senyal obtingut mentre que la transfecció d'un receptor D₂ quimèric on les hèlix 5 i 6 i el tercer *loop* intracel·lular s'han substituït pels del subtipus D₁, no en modifica el senyal.

Per altra banda, la *població 2* encara no té demostració experimental, tot i així, les estructures que proporciona són compatibles amb les que s'han proposat recentment per als homodímers del receptor de rodopsina (Liang et al., 2003).

De manera paral·lela a aquest treball i en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Woods, s'ha dut a terme una nova aproximació en l'estudi de les zones d'interacció de l'heterodímer A_{2A}/D₂. Els resultats apareixen en el treball de recerca que s'inclou en l'annex 1 d'aquesta Tesi:

Ciruela F., Burgueño J., Casadó V., Canals M., Marcellino D., Goldberg S., Bader M., Fuxe K., Agnati L., Lluís C., Franco R., Ferré S., Woods A., 2004 "Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization. Involvement of epitope-epitope electrostatic interactions", submitted to Proteins.

Una inspecció detallada de l'extrem C-terminal del receptor A_{2A} revela la presència de dos residus Asp que potencialment podrien interaccionar amb regions riques en Arg presents al tercer *loop* intracel·lular del receptor D₂. Així, s'han sintetitzat els pèptids corresponents a aquestes zones i la seva interacció s'ha demostrat tant per espectrometria de masses com per càlculs *Ab initio*. Aquests resultats s'han confirmat per experiments de *pull-down* en els quals el receptor natiu D₂ solubilitzat és arrossegat pel pèptid corresponent a l'A_{2A}R i la interacció entre el receptor A_{2A} natiu amb el pèptid corresponent a D₂R pot ser desplaçada pel pèptid corresponent a l'extrem C-terminal del receptor A_{2A}.

Finalment, utilitzant la construcció d'un receptor D_2 en el qual s'han mutat els residus d'Arg del tercer loop intracel·lular, s'observa una disminució significativa del senyal de BRET, resultats que reforcen aquestes zones com a dominis importants en la formació d'heteromers $A_{2A}R/D_2R$.

El fenomen d'homodimerització de GPCRs s'ha descrit per un nombre creixent de receptors com per exemple els receptors β -adrenergic (Hebert et al., 1996), D_2 de dopamina (Ng et al., 1996), mGluR5 (Romano et al., 1996), δ -opioid (Cvejic and Devi, 1997), muscarinic M3 (Bai et al., 1998), vasopressina V2 (Terrillon et al., 2003) o melatonina M2 (Ayoub et al., 2002). No obstant, l'homodimerització dels receptors d'adenosina no ha estat molt estudiada. Al 1995, el grup en el qual s'inclou aquesta tesi va demostrar l'existència d'homodimers del receptor A_1 en teixit de cervell de diferents espècies (Ciruela et al., 1995), però la capacitat d'homodimerització dels altres subtipus encara no ha estat investigada.

En el tercer treball inclòs en aquesta tesi, s'ha aprofitat l'experiència obtinguda en les tècniques de BRET i FRET per a estudiar la homodimerització dels receptors A_{2A} d'adenosina. Així, s'ha obtingut una corba de saturació de BRET analitzant el senyal generat en cèl·lules transfectades amb una quantitat constant d' A_{2A} -*Rluc* i una quantitat creixent d' A_{2A} -*YFP*. L'obtenció d'una corba hiperbòlica, així com el senyal indetectable del parell A_{2A} -*Rluc*/ $GABA_B$ R2-*YFP* confirmen l'existència d'homodimers d' $A_{2A}R$. No obstant, com s'ha esmentat anteriorment, en sistemes d'expressió heteròloga, s'ha detectat transferència d'energia entre molècules que, tot i no interaccionar, presenten una localització en microdominis determinats de la membrana plasmàtica que les situa a una distància suficientment petita (Zacharias et al., 2002). Així doncs, s'han tractat cèl·lules transfectades amb A_{2A} -*Rluc* i A_{2A} -*YFP* amb ciclodextrina- β per a disrompre els microdominis de membrana; com que la depleció dels nivells de colesterol no provoca cap canvi en el senyal de BRET obtingut, es confirma que aquest senyal prové realment d'homodimers.

El procés de dimerització en compartiments com el reticle endoplasmàtic (RE) sembla necessari per a que alguns receptors assoleixin la membrana plasmàtica i siguin funcionals (Margeta-Mitrovic et al., 2000), altres receptors s'ha demostrat que dimeritzen al RE tot i desconèixer el paper d'aquest procés. En altres casos, però, se suggereix que hi ha receptors que dimeritzen en ser estimulats pels corresponents lligands. L'observació que el lligand selectiu d' A_{2A} , CGS21680, no provoca cap canvi en el senyal obtingut, indica que quan aquest receptor s'estimula no hi ha canvis ni en la distància ni en el nombre de dimers formats i, a més, sembla suggerir que els homodimers d' A_{2A} es formen de manera constitutiva, probablement al RE.

Les tècniques de FRET i BRET aplicades no permeten la distinció entre els diferents compartiments cel·lulars. Experiments previs de fraccionament subcel·lular indiquen que les construccions utilitzades assoleixen la membrana però es desconeix quina és l'espècie funcional. Experiments de biotillitació de proteïnes de membrana i de *Time-Resolved* FRET han demostrat que en la membrana plasmàtica l'espècie majoritària és l'homodimer. *Time-Resolved* FRET permet el marcatge amb anticossos fluorescents dels receptors a la membrana

plasmàtica i la detecció de la transferència d'energia que se'n pugui generar. Per altra banda, els experiments de biotinització de les proteïnes de membrana demostren que més d'un 90% dels receptors detectats pertanyen a la forma dimèrica dels receptors.

Els treballs descrits, doncs, donen suport a la teoria segons la qual l'oligomerització és un estat freqüent dels GPCRs i aporten nous receptors a la llista creixent de receptors capaços d'oligomeritzar. L'homo- i heterodimerització, a més, afegixen un nou nivell de complexitat en la regulació de la senyalització dels GPCRs on els receptors no actuen com a entitats monomèriques sinó que formen part de mòduls funcionals a la membrana cel·lular, formats tant per GPCRs com per proteïnes accessòries, i els quals podrien tenir una funció d'integració de diferents senyals.

Els nivells d'adenosina extracel·lular varien d'una manera dinàmica; tan en condicions d'elevada demanda metabòlica, com en condicions d'hipoxia es produeix un increment d'aquests nivells, els quals són regulats per enzims i transportadors específics. No obstant l'adenosina, com s'ha esmentat prèviament, pot actuar com a neuromodulador a través dels seus receptors. Els subtipus A_1 i A_{2A} (A_1R i $A_{2A}R$) són expressats majoritàriament en el sistema nerviós; però, mentre que la distribució dels A_1R és bastant general, $A_{2A}R$ es localitzen de manera majoritària a l'estriat i algunes parts dels ganglis basals. El fet que tant A_1R com $A_{2A}R$ s'expressin en etapes embrionaries, suggereix la possibilitat que aquests receptors puguin participar en processos de diferenciació neuronal. Així doncs, en la última part d'aquesta Tesi s'ha estudiat l'efecte de l'estimulació, independent d'altres factors de creixement o diferenciació, dels receptors A_1 i A_{2A} d'adenosina i el seu paper en els processos de diferenciació neuronal.

Les cèl·lules de neuroblastoma humà SH-SY5Y són un sistema molt ben caracteritzat per a estudiar la diferenciació neuronal *in vitro*. Tant en treballs previs (Salim et al., 2000) com en el que es presenta en aquesta Tesi s'ha confirmat que aquestes cèl·lules expressen de manera endògena els receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} . A més, quan es tracten amb agents diferenciadors tals com l'àcid retinoic o NGF (Nerve Growth Factor), aquestes cèl·lules frenen el seu cicle cel·lular i inicien uns processos d'extensió de neurites que les condueixen cap a un fenotip neuronal (Pahlman et al., 1984). Així doncs, l'àcid retinoic s'ha utilitzat en tot el treball com a tractament control per a processos de neuritogènesi en els que l'estimulació dels receptors d'adenosina s'ha fet emprant els agonistes selectius corresponents, és a dir R-PIA per a A_1R i CGS21680 per a $A_{2A}R$.

Així, utilitzant microscopia confocal i de contrast de fases s'observa que el tractament amb tots dos agonistes induïx neuritogènesi. Estudis de temps-resposta i dosi-resposta mostren que l'efecte màxim s'assoleix a una concentració de 100 nM i 24 hores tant d'R-PIA com de CGS21680.

Per tal de determinar si el creixement de neurites induït per R-PIA i CGS21680 són estadis inicials del procés de diferenciació neuronal, s'han estudiat dos marcadors neuronals. En primer lloc s'ha analitzat l'expressió del receptor TrkB a través de les tècniques d'immunocitoquímica i de western blot de lisats de

cèl·lules tractades. Ambdues tècniques mostren que el tractament de 24 hores amb 100 nM de R-PIA o CGS21680 provoquen un augment en els nivells de TrkB detectat. Finalment, s'ha analitzat la distribució del cicle cel·lular en aquests tractaments i s'ha observat que aquests tractaments presenten una tendència a aturar les cèl·lules en fase G₁. Aquests resultats, doncs, suggereixen que els processos de creixement de neurites induïts per l'activació d'A₁R i A_{2A}R són esdeveniments inicials de diferenciació de la línia cel·lular SH-SY5Y cap a un fenotip neuronal.

Els mecanismes de transducció de senyal que provoquen la neuritogènesi són encara poc clars. Alguns autors consideren la ruta de les MAPK com a via determinant en aquests processos mentre d'altres suggereixen que les MAPK participarien en la inducció de gens de diferenciació però no en el creixement de neurites. Tot i així, de manera general s'accepta que la fosforilació d'ERK-1/2 és necessària per a la transducció de senyal en el procés de diferenciació neuronal.

Treballs anteriors han descrit que la ruta de les MAPK pot ser activada per tots els subtipus de receptors d'adenosina (Seidel et al., 1999). Així, en cèl·lules SH-SY5Y s'observa que tant A₁R com A_{2A}R són capaços d'activar p21Ras i de fosforilar ERK-1/2 essent la màxima resposta observada a 3 i 5 min d'activació amb 100 nM de R-PIA i CGS21680 respectivament i inhibida pels corresponents antagonistes (DPCPX per A₁R i ZM241385 per a A_{2A}R). A més, s'han utilitzat una sèrie d'inhibidors per tal de caracteritzar el mecanisme de transducció de senyal pel qual s'indueix la fosforilació d'ERK-1/2 (PD98059 com a inhibidor de MEK, H89 com a inhibidor de PKA i GF109203X com a inhibidor d'isoformes noves i convencionals de PKC). Mentre que la fosforilació induïda per R-PIA únicament s'inhibeix quan les cèl·lules es tracten amb PD98059, la fosforilació induïda per CGS21680 és també inhibida amb H89. Aquests resultats suggereixen doncs que la fosforilació d'ERK-1/2 induïda per R-PIA es independent de PKA i PKC mentre que la via induïda per CGS21680 depèn de PKA però no de PKC. Això concorda amb l'acoblament dels receptors A_{2A} amb proteïnes del tipus G_s les quals indueixen augments en els nivells d'AMPc intracel·lular.

Els mateixos inhibidors s'han utilitzat per a estudiar la contribució de cada via de transducció de senyal en els processos de diferenciació. L'activació d'A₁R per R-PIA o d'A_{2A}R per CGS21680 produeixen creixement de neurites que és inhibit parcialment per PD98059 o GF109203X però, en canvi, s'inhibeixen totalment quan tots dos inhibidors s'utilitzen simultàniament. Això indica que tan la via de MAPK com PKC intervien de manera paral·lela en el procés de diferenciació iniciat per un o altre receptor. L'observació que H89 no afecta la neuritogènesi induïda per R-PIA permet concloure que PKA no està involucrada en aquest procés. No obstant, l'activació d'A_{2A}R presenta un panorama més complex. El fet que l'inhibidor de PKA provoqui una inhibició total de la neuritogènesi induïda per CGS21680, situa a aquest enzim com a possible activador de la cascada MEK/ERK la qual en combinació amb PKC conduiria a processos de diferenciació; en aquest cas, caldria una molècula que actués d'unió entre PKA i PKC o, alternativament, que PKA activés alguna cascada de senyalització essencial per a la translocació de PKC al nucli.

Finalment, per estudiar un sistema més fisiològic, s'ha evaluat l'efecte de l'estimulació dels receptors A₁ i A_{2A} en el creixement i la diferenciació en cultius

primaris de neurones. Els precursors neuronals s'han tractat immediatament després de la descongelació amb 100 nM R-PIA o CGS21680 i se'n ha seguit l'evolució. S'observa que, després d'una setmana d'incubació les cèl·lules tractades ja presenten una morfologia més neuronal que no pas els controls mentre que després de dues setmanes tots els tractaments i controls assoleixen un estat plenament diferenciat. Per tant, l'activació d'A₁R i A_{2A}R acceleren la diferenciació neuronal.

CONCLUSIONS

- L'estimulació per agonistes dels receptors A_1 i A_{2A} d'adenosina (A_1R i $A_{2A}R$) indueix el creixement de neurites en les cèl.lules de neuroblastoma SH-SY5Y com a estadi inicial per la seva diferenciació. En aquest procés hi ha implicades dues vies de transducció del senyal, MAPK i PKC. Addicionalment, l'activació d'ambdós receptors accelera el procés de diferenciació en cèl.lules precursors neuronals.
- Els receptors A_{2A} formen homodimers. Aquests homodimers, i no pas els monòmers, són les espècies funcionals a la membrana cel.lular. Tot i així, malgrat que l'activació per agonsites comporta la formació de "clusters" d'aquest receptor, el grau de dimerització no es modifica.
- $A_{2A}R$ i els receptors D_2 de dopamina (D_2R) formen heterodimers. L'heterodimerització s'ha demostrat en cèl.lules de neuroblastoma SH-SY5Y transfectades de manera estable amb D_2R . En aquestes cèl.lules, l'estimulació d' $A_{2A}R$ i/o D_2R indueix la co-agregació i la co-internalització d'ambdós receptors, fenomen observat també en cultius primaris de neurones d'estriat.
- Els heterodimers A_{2A}/D_2 s'han detectat en cèl.lules vives. En aquest cas s'ha observat que l'estimulació d'ambdós receptors no modifica ni el nombre ni la distància en l'heteromer. Els heterodimers A_{2A}/D_2 poden ser els responsables, en part, de les fortes interaccions antagòniques detectades a nivell funcional entre els receptors A_{2A} d'adenosina i els receptors D_2 de dopamina.
- Estudis teòrics de modelatge molecular i aproximacions experimentals han demostrat que l'hèlix 5 i/o l'hèlix 6 i la part N-terminal del tercer bucle intracel.lular de D_2R i l'hèlix 4 i la cua C-terminal d' $A_{2A}R$ són dominis importants d'interacció dins l'heteromer A_{2A}/D_2 . A més, també s'han identificat interaccions de tipus electrostàtic entre epítops.
- Existeixen grans diferències estructurals entre els homodimers d' $A_{2A}R$ i els heterodimers A_{2A}/D_2 ja que, mentre la cua C-terminal d' $A_{2A}R$ està implicada en la formació dels complexos heteromèrics, aquesta no participa en el fenomen d'homodimerització.