



Regulación epigenética de la expresión estriatal del receptor de adenosina A_{2A} en enfermedades neurológicas con trastorno motor asociado

Izaskun Villar Menéndez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartiqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartiqual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

**REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN ESTRIATAL DEL RECEPTOR
DE ADENOSINA A_{2A} EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS CON
TRASTORNO MOTOR ASOCIADO**

Izaskun Villar Menéndez

Directora/tutora de la tesis: Dra. Marta Barrachina Castillo

Marzo de 2014



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Facultad de Farmacia

Programa de Doctorado en Biomedicina

**REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA EXPRESIÓN ESTRIATAL DEL RECEPTOR
DE ADENOSINA A_{2A} EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS CON
TRASTORNO MOTOR ASOCIADO**

Memoria presentada por Izaskun Villar Menéndez para optar al título de doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección y supervisión de la doctora Marta Barrachina en el Instituto de Neuropatología del Hospital Universitario de Bellvitge (IDIBELL).

Directora/tutora:

Dra. Marta Barrachina Castillo

Autora:

Izaskun Villar Menéndez

Marzo de 2014

A los donantes y sus familias,
por tomar una decisión que no es fácil,
pero que permite el avance de un trabajo que da esperanzas a mucha gente

Índice

Lista de abreviaturas.....11

I INTRODUCCIÓN

1 El receptor de adenosina A_{2A}

1.1 La Adenosina

1.1.1 Metabolismo de la Adenosina.....16

1.1.2 Incremento en los niveles de adenosina.....19

1.2 Efectos de la Adenosina

1.2.1 Los receptores de adenosina.....20

1.2.2 La Adenosina en el Sistema Nervioso Central.....22

1.2.3 Potencial terapéutico de la modulación adenosinérgica.....24

1.3 El receptor de adenosina A_{2A}

1.3.1 El gen *ADORA2A*.....26

1.3.2 Estructura de la proteína.....27

1.3.3 Efectos de la activación del receptor de adenosina A_{2A}R.....27

1.3.4 Regulación de la actividad del receptor de adenosina A_{2A}.....28

1.3.5 Distribución.....29

2 Los ganglios basales y el control motor

2.1 El circuito córtico-basal-talámico

2.1.1 Los ganglios basales.....32

2.1.2 Papel de la sustancia negra en el control motor.....33

2.1.3 Papel del estriado en el control motor.....33

2.1.4 Relevancia del A_{2A}R en el control motor.....35

2.1.5 Evidencias de la relevancia del A_{2A}R en el control motor.....37

3 Enfermedades neurológicas con trastorno motor asociado tratadas en este trabajo

3.1 La enfermedad de Parkinson

3.1.1 El trastorno motor en la enfermedad de Parkinson.....41

3.1.2 Clínica.....43

3.1.3 Etiología.....45

3.1.4 El receptor de adenosina A_{2A} en la enfermedad de Parkinson.....46

3.2 La enfermedad de Huntington

3.2.1 El trastorno motor en la enfermedad de Huntington.....48

3.2.2 Clínica.....49

3.2.3 Etiología.....49

3.2.4 El receptor de adenosina A_{2A} en la enfermedad de Huntington.....50

3.3 La Esquizofrenia	
3.3.1 El trastorno motor en la esquizofrenia.....	53
3.3.2 Clínica.....	54
3.3.3 Etiología.....	55
3.3.4 El receptor de adenosina A _{2A} en la esquizofrenia.....	57

4 Regulación epigenética

4.1 Modificación química del ADN

4.1.1 Metilación.....	62
4.1.2 Hidroximetilación.....	62

4.2 Modificación química de histonas

4.3 Micro ARNs

4.4 Desregulación epigenética y neurodegeneración

4.4.1 Alteraciones epigenéticas en la enfermedad de Parkinson.....	67
4.4.2 Alteraciones epigenéticas en la enfermedad de Huntington.....	67
4.4.3 Alteraciones epigenéticas en la esquizofrenia.....	69

5 El trabajo con material procedente de bancos de tejido humano

5.1 Características limitantes del material procedente de los bancos de tejidos

5.1.1 Estado de conservación.....	71
5.1.2 Escasez.....	72
5.1.3 Heterogeneidad.....	72
5.1.4 Comorbilidad.....	72

II OBJETIVOS

Objetivos.....	75
----------------	----

III PUBLICACIONES

Artículo en revisión.....	79
Artículo publicado I.....	103
Artículo publicado II.....	119

IV ANEXO:

otras publicaciones

Participación en otros trabajos.....	135
--------------------------------------	-----

V RESUMEN DE RESULTADOS

Resumen de resultados.....	139
----------------------------	-----

VI DISCUSIÓN

1 Potencial traslacional de la manipulación del perfil de metilación del ADORA2A en el putamen....

2 Efectos de las modificaciones del perfil de metilación sobre la actividad transcripcional.....

3 Discusión de los resultados obtenidos en cada contexto patológico

3.1 La enfermedad de Parkinson

- 3.1.1 El papel del microARN hsa-miR-34b en la regulación de la expresión del A_{2A}R en la EP.....152
- 3.1.2 El papel de la metilación en la regulación de la expresión del A_{2A}R en la EP.....153
- 3.1.3 Potencial traslacional de estos resultados el la EP.....153

3.2 La enfermedad de Huntington

- 3.2.1 Mecanismos de represión transcripcional en la EH.....154
- 3.2.2 Las modificaciones químicas del ADN participan en la represión transcripcional en la EH.....155
- 3.2.3 Potencial traslacional de estos resultados en la EH.....156

3.3 La esquizofrenia

- 3.3.1 La teoría de la hipoadenosinergia. El estudio del receptor de adenosina A_{2A} en la esquizofrenia.....157
- 3.3.2 La hipermetilación está implicada en la reducción de la expresión del A_{2A}R.....158
- 3.3.3 La clasificación de los pacientes en subgrupos siguiendo como criterio una alteración motora.....159
- 3.3.4 Potencial traslacional de estos resultados el la esquizofrenia.....160

VII CONCLUSIONES

- Conclusiones.....163

VIII

AGRADECIMIENTOS

- Agradecimientos.....167

IX BIBLIOGRAFÍA

- Bibliografía.....171

Abreviaturas

5'-NT: ecto-5'-nucleotidasa	EP: enfermedad de Parkinson
A₁R: receptor de adenosina A ₁	FAD: flavín adenín dinucleótido
A_{2A}R: receptor de adenosina A _{2A}	GABA: ácido aminobutírico
A_{2B}R: receptor de adenosina A _{2B}	Ge: proteína G inhibidora de la AC
A₃R: receptor de adenosina A ₃	Gi: proteína G inhibidora de la AC
AC: adenilato ciclasa	GIRK: canales rectificadores de potasio acoplados a proteína G
ADA: adenosín deaminasa	Golf: proteína G olfatoria
AdK: adenosín quinasa	GPCR: receptor acoplado a proteína G
ADN: ácido desoxirribonucleico	GPlat: globo pálido lateral
ADP: adenosín difosfato	GPm: globo pálido medio
AMP: adenosín monofosfato	Gq: proteína G con subunidad α tipo q
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	GTP: guanosina trifosfato
ARN: ácido ribonucleico	HAT: acetilasa de histona
ARNm: ARN mensajero	HATi: inhibidor de las HATs
ATP: adenosín trifosfato	HDAC: deacetilasa de histona
BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro	HDACi: inhibidor de las HDACs
CBP: proteína de unión a CREB	Httm: Huntingtina mutada
CN-1: 5'-nucleotidasa citosólica 1	IP3: inositol trifosfato
CNT: transportadores concentradores de nucleósidos	MBD: proteína de unión a metilo
COMT: catecol-o-metiltransferasa	NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
COOH: grupo carboxilo	NH₂: grupo amino
CREB: factor de transcripción que responde a AMPc (<i>cAMP response element-binding</i>)	NMDA: receptores ionotrópicos de glutamato sensibles a N-Metil-D-aspartato
D₁R: receptor de dopamina D ₁	NsubT: núcleo subtalámico
D₂R: receptor de dopamina D ₂	pb: pares de bases
DAG: diacilglicerol	PKA: proteín quinasa A
DNMT: ADN metil transferasas	PLC: fosfolipasa C
EctoN: ectonucleotidasa	SAH: S-adenosil homocisteína
EH: enfermedad de Huntington	SAHH: hidrolasa de SAH
ENT: transportadores equilibradores de nucleósidos	SAM: S-adenosil metionina
	SNC: sistema nervioso central
	SNc: sustancia negra compacta
	SNr: sustancia negra reticulada

I. INTRODUCCIÓN

1. El receptor de adenosina A_{2A}

1.1 *La Adenosina*

La adenosina es un nucleósido formado a partir de la unión de la adenina y una ribosa. La adenina, a su vez, es un compuesto aromático heterocíclico del tipo purina. Las purinas (adenina y guanina) tienen un papel fundamental como elemento estructural de los ácidos nucleicos, y forman parte de múltiples biomoléculas de gran importancia para el funcionamiento celular. La adenosina, en concreto, tiene una especial relevancia en lo que se refiere al metabolismo energético de la célula, ya que constituye el sustrato sobre el que se añaden fosfatos mediante enlaces de alto contenido energético produciendo progresivamente AMP, ADP y ATP. También forma parte del NAD y el FAD, que participan en las reacciones de oxidación reducción y la acumulación de energía en forma de ATP. Otras moléculas que contienen adenosina son el AMPc, importante mensajero secundario celular o el SAM, principal donador de grupos metilo en la célula que participa en la regulación transcripcional del ADN.

Por tanto, la adenosina como tal y formando parte de otras moléculas está presente en todas las células del organismo. Debido a su intervención en el ciclo energético, su metabolismo es muy rápido y sensible a procesos de hipoxia. Cuando se produce un desequilibrio patológico entre el aporte y el consumo de energía, la degradación de los reservorios energéticos de la célula conduce a un aumento en su concentración. Cuando la diferencia entre su concentración dentro y fuera de las células es muy grande, sale al exterior, desde donde desencadena una respuesta homeostática de efectos protectores que reduce la actividad celular.

Además, las purinas tienen un papel distintivo en la regulación de la actividad de las células excitables, como las del tejido cardíaco o el sistema nervioso, que cuentan con receptores de membrana tanto para ATP (cuya actividad como neurotransmisor fue propuesta ya por Burnstock en 1970 (Burnstock et al., 1970)) como para adenosina. El papel como neuromodulador de la transmisión sináptica de la adenosina en el sistema nervioso central será desarrollado a lo largo del presente trabajo.

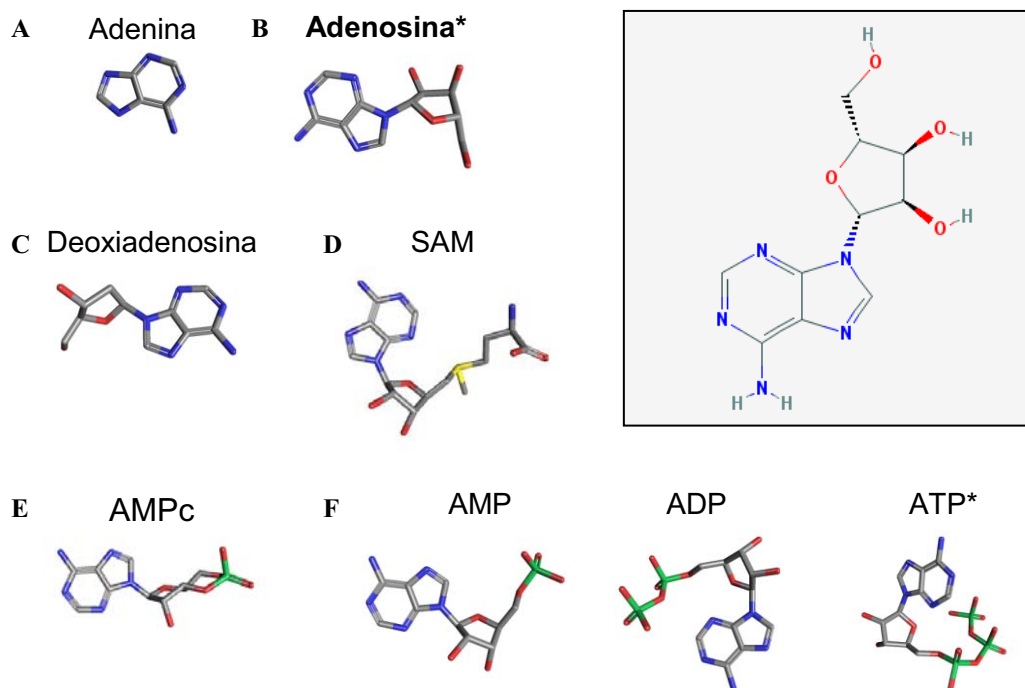


Figura 1. Naturaleza química de la adenosina y moléculas que la contienen. Estructura química de la adenina (A), base de la adenosina (B, estructura química en 2 y 3D). El resto de figuras corresponde a las estructuras químicas en 3D de moléculas cuya estructura contiene adenosina como elemento fundamental. C, deoxiadenosina, uno de los cuatro elementos estructurales básicos del ADN. D, S-adenosil metionina (SAM), principal donador de grupos metilo en las reacciones de metilación. E, AMP cíclico, mensajero secundario celular que participa en gran cantidad de procesos de señalización. F, adenosina mono, di y trifosfato, reservorios de energía de la célula; *existen receptores de membrana tanto para el ATP como para la adenosina, por lo que pueden desencadenar procesos de señalización celular. Todas las figuras han sido tomadas de la base de datos de PubChem.

1.1.1 Metabolismo de la Adenosina

Dado su papel en el ciclo energético y su capacidad para desencadenar cascadas de señalización celular mediante la unión a sus receptores, la concentración de adenosina está estrechamente regulada. La medida del contenido en adenosina plantea dificultades técnicas, por lo que la bibliografía no proporciona datos unívocos. Tras comparar distintos trabajos y técnicas, Latini y colaboradores aportan unos valores de adenosina extracelular en cerebro que pueden oscilar entre 50 y 200 nM en condiciones basales (Latini and Pedata, 2001). No obstante, estos niveles pueden aumentar rápidamente hasta 40 μ M cuando el tejido es sometido a isquemia (Hagberg et al., 1987) o hipoxia (Zetterstrom et al., 1982).

a) Anabolismo

Como representa la figura 2A (página 18), existen varios enzimas en la célula capaces de producir adenosina. La familia de las nucleotidasas 5' específicas de AMP incluye formas con actividad citosólica (la cN-1) y formas adheridas a la membrana plasmática con actividad extracelular (la 5'-NT o CD73), que hidrolizan el AMP a pirofosfato y adenosina. Las fosfatasas alcalinas, ubicuas, también catalizan esta misma reacción (Aliagas et al., 2013; Hunsucker et al., 2001; Latini and Pedata, 2001). Todas ellas se expresan en cerebro. Además, la hidrólisis de la S-adenosil homocisteína (SAH) es otra posible fuente de adenosina, aunque la reacción, catalizada por la hidrolasa de SAH, es bidireccional. Se considera que esta reacción tiene un papel menor en cualquiera de sus direcciones, y normalmente su aporte al consumo o producción de adenosina en los procesos celulares es desestimado (Latini et al., 1995; Reddington and Pusch, 1983).

b) Catabolismo

Hay dos enzimas fundamentales responsables del consumo de adenosina. La adenosina desaminasa (ADA), que cataliza la reacción de desaminación de la adenosina para producir inosina, y la adenosín quinasa (AdK), que transfiere un fosfato del ATP a la adenosina, produciendo AMP. Ambas se expresan en el cerebro. No obstante, la afinidad de la AdK por la adenosina es superior (Phillips and Newsholme, 1979), de manera que la ADA no entra en funcionamiento hasta que los niveles de adenosina aumentan e inhiben la AdK (figura 2B, página 18) (Latini and Pedata, 2001).

c) Transporte

El transporte de adenosina hacia el interior celular es fundamental para las células, pues constituye una fuente principal de sustrato para la síntesis de ATP. El transporte de la adenosina, como el de otros nucleósidos, puede ser activo o pasivo. Los transportadores equilibradores de nucleósidos (ENT) son proteínas de membrana ubicuas que median el transporte de purinas y pirimidinas a favor de gradiente. Permiten la recuperación de adenosina del medio extracelular cuando su concentración es elevada, pero también su salida cuando hay un pico de concentración en el interior celular a causa de un estrés metabólico. Se han identificado cuatro tipos en humanos: hENT1, hENT2, hENT3 y hENT4 (Baldwin et al., 2004). Los transportadores concentradores de nucleósidos (CNT) median el transporte activo (energético-dependiente) hacia el interior celular, aprovechando el gradiente de Na⁺. Existen tres variantes, siendo el CNT2 el más expresada en cerebro (Gray et al., 2004). Aunque son menos abundantes, tienen más afinidad por el sustrato que los ENT (figura 2C, página 18) (Larrayoz et al., 2004).

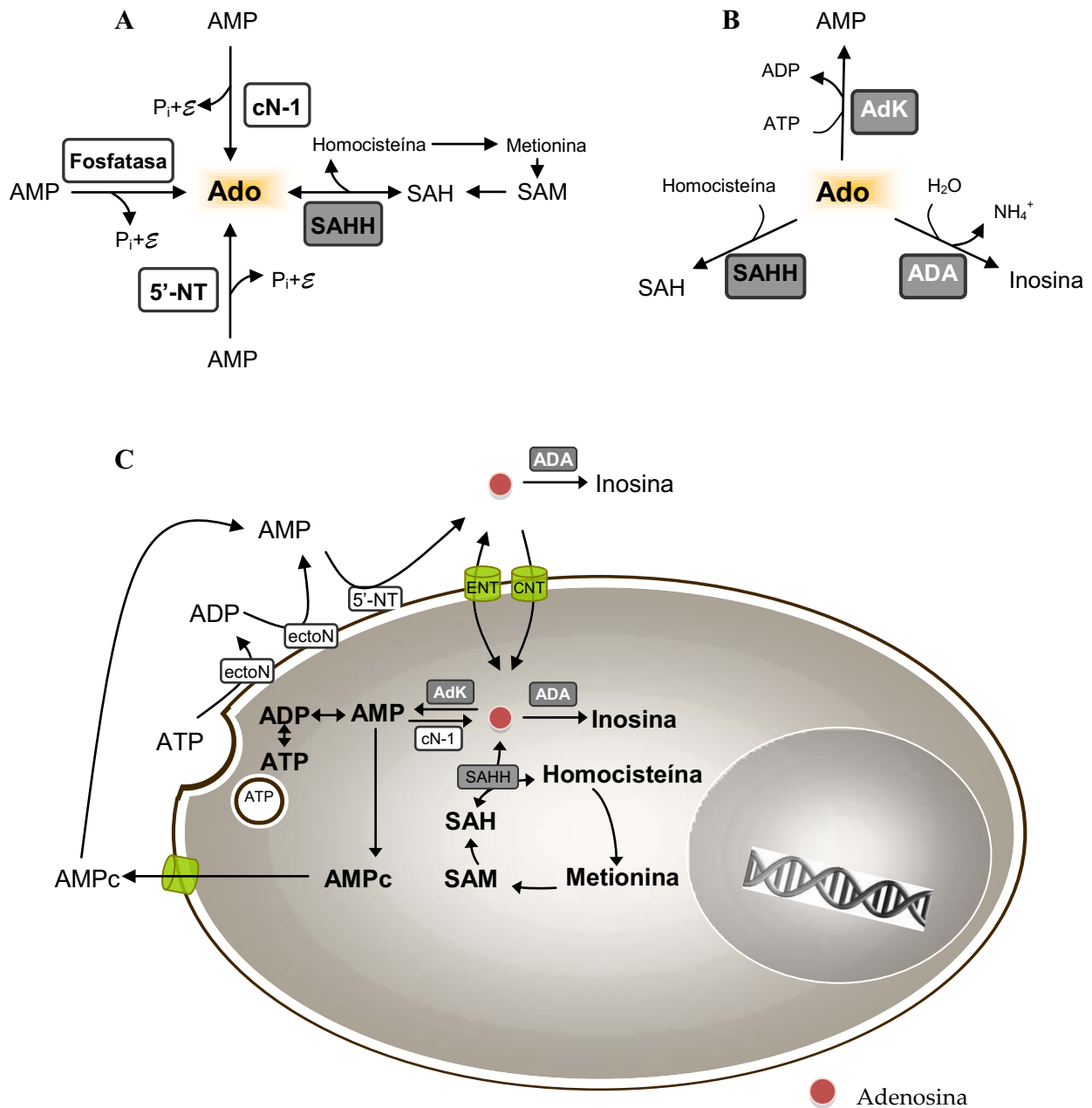


Figura 2. Metabolismo de la adenosina. A, diferentes vías productoras de adenosina. Enzimas que liberan adenosina a partir de la hidrólisis del AMP: 5'-NT (ecto-5'-nucleotidasa, que actúa extracelularmente), cN-1 (nucleotidasa 5' específica de AMP, de actividad intracelular), fosfatasas. Enzimas que liberan adenosina a partir de la hidrólisis de la S-Adenosilhomocisteína (SAH): SAHH (hidrolasa de la SAH). B, diferentes vías que consumen adenosina. Síntesis de AMP, catalizada por la adenosín quinasa (AdK). Síntesis de S-Adenosilhomocisteína (SAH), catalizada por la hidrolasa de SAH (SAHH). Degradación de la adenosina a inosina, catalizada por la adenosín desaminasa (ADA). C, metabolismo celular de la adenosina. Se representan en la figura las vías de producción y consumo de adenosina mencionadas previamente, así como los transportadores específicos: ENT (transportadores equilibradores) y CNT (transportadores concentradores). EctoN (ectonucleotidasas).

1.1.2 Incremento en los niveles de adenosina

La adenosina es la base estructural del ATP, el reservorio energético de la célula. En situaciones de demanda, su hidrólisis proporciona la energía requerida, a medida que produce, secuencialmente, ADP, AMP, y adenosina. Como metabolito final de esta cascada de producción energética, la adenosina tiene un papel regulador fundamental del metabolismo celular cuando hay un desequilibrio entre el aporte y el consumo de energía.

a) Vía clásica

En condiciones basales, los niveles de adenosina en el citosol son muy inferiores a los de ATP. Ante una demanda energética, el catabolismo del ATP origina un aumento en los niveles de adenosina en el interior de la célula que pasan de estar en el rango de nM al de μ M (Cunha, 2001). En determinadas situaciones, como en hipoxia o isquemia, la célula no está en condiciones de contrarrestar ese catabolismo con un anabolismo opuesto, de modo que la célula acumula adenosina. Como resultado se origina un transporte pasivo al exterior vía ENTs. Esta forma de incrementar los niveles extracelulares de adenosina es la considerada como la clásica, y ha sido observada tanto en neuronas como en astrocitos (Martin et al., 2007).

b) Vías alternativas

ATP y AMPc son transportados al exterior celular tanto por neuronas (Burnstock et al., 1970; Pankratov et al., 2006) como por la glía (Pascual et al., 2005), y una vez allí son degradados a adenosina. El ATP es rápidamente degradado por las ectonucleotidasas manteniendo los niveles tónicos de adenosina en el medio en condiciones de normoxia (Martin et al., 2007). La conversión extracelular de AMPc en AMP, catalizada por las fosfodiesterasas, proporciona también un sustrato para la obtención de adenosina, pero de manera mucho más lenta, y no parece relacionada con el tipo de respuesta del que hablamos aquí (Brundege et al., 1997). La inhibición de los enzimas implicados en las vías alternativas no altera el efecto de la hipoxia en los niveles de adenosina, lo que refuerza su origen intracelular en esas condiciones, a través de la vía clásica (Martin et al., 2007).

1.2 Efectos de la Adenosina

La adenosina ejerce una gran variedad de efectos fisiológicos según el tejido en el que actúe. Uno de sus papeles más extendidos es el de regulador homeostático. Cuando se produce un

desequilibrio entre aporte y consumo energético los niveles de adenosina en el medio extracelular aumentan. Esto proporciona un sustrato para la síntesis de ATP, que sería la propia adenosina, y pone en marcha una serie de respuestas (aumento del flujo sanguíneo, inhibición metabólica) dirigidas a la recuperación del balance energético (Ely and Berne, 1992; Gomes et al., 2011; Newby, 1984). La adenosina puede actuar de forma autocrina (puesto que una misma célula puede expresar todas las moléculas necesarias para producir y recibir la señal) o paracrina, en un mecanismo clásico de retroalimentación que contrarresta el estímulo que provoca excesivo consumo de ATP (Borowiec et al., 2006). La adenosina ha sido relacionada con mecanismos antiinflamatorios (Cronstein, 1994), supresión del sistema inmune (Spychala et al., 1997), efectos analgésicos (Sawynok and Sweeney, 1989), procesos de proliferación, supervivencia y apoptosis de diversos tipos celulares (Borowiec et al., 2006; Jacobson et al., 1999; Schulte and Fredholm, 2003).

1.2.1 Los receptores de adenosina

La adenosina ejerce sus efectos mediante su unión a receptores de membrana específicos, que activan vías de señalización celular y además son capaces de modular, mediante interacción con otros receptores, la comunicación celular a través de otras vías.

Existen cuatro receptores de membrana específicos para la adenosina (ver tabla 1, página 21): A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. La nomenclatura para los estos receptores ha ido cambiando a medida que se ha mejorado su definición y clasificación. Los primeros trabajos de Burnstock establecieron la diferencia entre receptores purinérgicos P₁ (para adenosina) y P₂ (para ATP). Van Calker distinguió poco después entre dos tipos de P₁, en función de si reducían (A₁) o incrementaban (A₂) los niveles de AMPc en las células. Posteriormente, los A₂R fueron subdivididos en A_{2A}R y A_{2B}R, según los niveles de adenosina que requerían para activarse (Schulte and Fredholm, 2003). El descubrimiento del receptor A₃ es más reciente (Zhou et al., 1992). A lo largo de los 90, los cuatro tipos de receptores de adenosina fueron clonados a partir de varias especies y caracterizados farmacológicamente (Fredholm et al., 2001; Gudermann et al., 1997).

a) Activación de las vías de señalización celular

Los cuatro receptores de adenosina son proteínas con siete dominios transmembrana acopladas a proteína G, por lo que se engloban entre las GPCR (receptores acoplados a proteína G). "Proteína G" alude en realidad a toda una familia de proteínas transductoras de señal que se caracterizan por su interacción con GTP. Existen varios tipos de proteína G, según el sistema efector

Subtipo de receptor	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Afinidad por la adenosina	~100nM	~310nM	~15000nM	~290nM
Agonistas inespecíficos	Adenosina, 2-Cloro-adenosina, NECA			
Antagonistas inespecíficos	Cafeína, teofilina, CGS15943			
Elevada expresión en cerebro	Córtex, hipocampo, cerebelo, tálamo, bulbo raquídeo	Estriado, bulbo olfatorio	No	No
Subtipo de proteína G	G _{i1/2/3} , G _o	G _s , G _{olf} , G _{q15/q16}	G _s , G _{q11}	G _{i2/3} , G _{q11}
Efectos de la unión a la proteína G	↓ AMPc ↑ IP3/DAG (vía PLC) Activa GIRKs Inhibe canales de Ca ²⁺	↑ AMPc ↑ IP3	↑ AMPc ↑ IP3/DAG (vía PLC)	↓ AMPc ↑ IP3/DAG (vía PLC)

Tabla 1. Sumario de la distribución de los receptores de adenosina y su unión a proteína G. Adaptada de Fredholm et al., (2011); Fredholm et al., (2000). GIRK: canales rectificadores de K⁺ acoplados a proteína G (G-protein inwardly rectifying K⁺ channels), IP3: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PLC: fosfolipasa C.

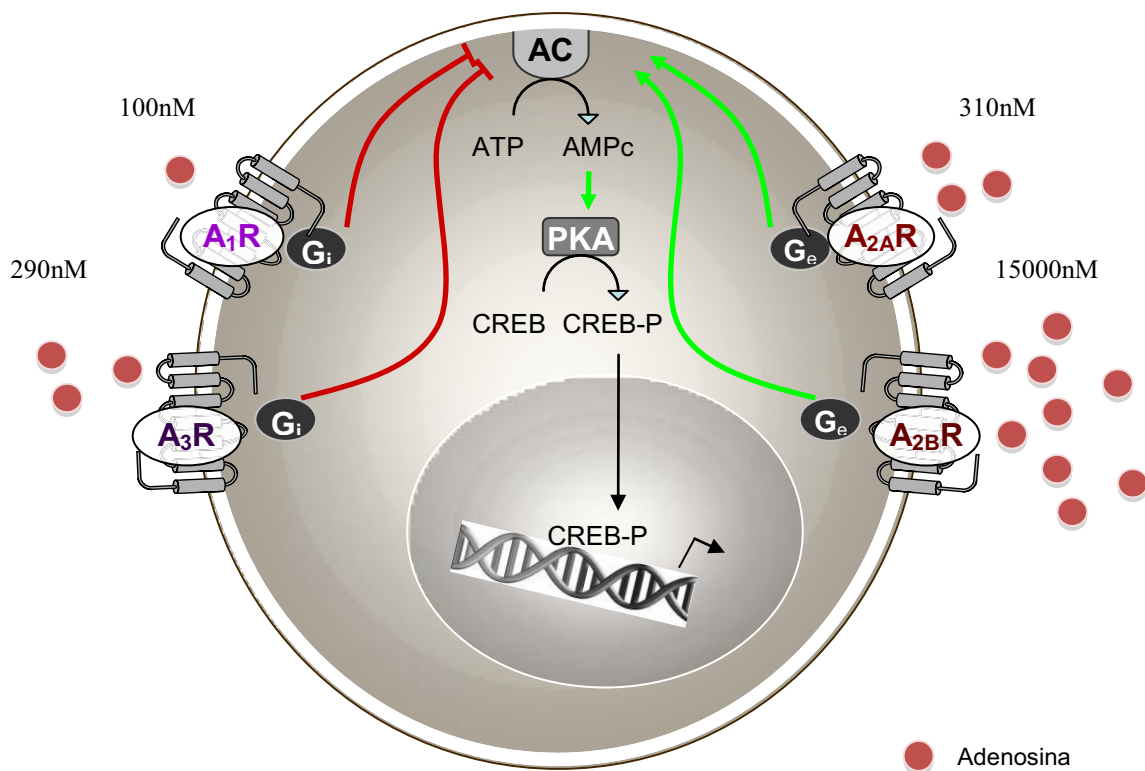


Figura 3. Receptores de adenosina y su relación con la vía de la fosfoquinasa A (PKA) a través de la unión a proteína G. Se representa esquemáticamente la concentración necesaria para la activación de cada subtipo de receptor de adenosina. AC: adenilato ciclasa.

con que interactúen y cómo. La vía mejor definida es la de la proteína quinasa A (PKA) (Londos et al., 1980): la adenilato ciclasa (AC) se ve inhibida por las proteínas G inhibitoras (Gi) y activada por las estimuladoras (Ge) (figura 3, página 21). Así las GPCRs pueden modular los niveles de AMPc, que regulan la actividad de la PKA y con ello la fosforilación de CREB. También hay proteínas G que activan la fosfolipasa (Gq) (Dickenson and Hill, 1998), o que interaccionan con canales iónicos (Ikeda, 1996). Cada receptor activa un tipo determinado de proteína G, y cada tipo celular expresa un juego particular de estas proteínas, lo que permite modular de manera tejida específica los efectos de la activación de cada receptor (Kull et al., 2000; Offermanns and Simon, 1998).

b) Interacción con otros receptores de membrana

Los receptores de adenosina tienen además la capacidad de modular indirectamente la sensibilidad celular a otros sistemas de señal mediante la formación de heterodímeros con otros receptores de membrana. Esta heterodimerización afecta a las características dinámicas de los receptores. Aunque en los últimos años se han dado pasos hacia el uso de tejidos nativos, las evidencias aportadas para demostrar este fenómeno están fundamentalmente basadas en el uso de líneas celulares transfectadas que sobreexpresan los receptores. Pese a todo, hoy es aceptada la existencia de oligómeros entre GPCRs. En la bibliografía se pueden encontrar trabajos en los que se describen la homomerización de este tipo de receptores (Lukasiewicz et al., 2007) y también la formación de heterómeros, que incluyen dos (Carriba et al., 2007) o incluso tres tipos de receptor en la interacción (Cabello et al., 2009; Navarro et al., 2008). Por mencionar los más importantes para el presente trabajo, las implicaciones de la formación de los dímeros A_{2A}R-A₁R (Ciruela et al., 2006) y A_{2A}R-D₂R (Ferre et al., 1991; Franco et al., 2000; Fuxe et al., 1998) serán tratadas a lo largo de la introducción (apartado 2.1.4).

1.2.2 La Adenosina en el Sistema Nervioso Central

La adenosina ha sido relacionada con numerosos procesos fisiológicos y patológicos propios del sistema nervioso central (SNC), como la regulación del sueño, los procesos cognitivos, la memoria, el aprendizaje, la neuroprotección, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el dolor... (Ribeiro et al., 2002). Los receptores de adenosina son especialmente abundantes en el SNC (Dunwiddie and Masino, 2001) y el café, cuyo consumo habitual está muy extendido en diversas culturas, muestra a este nivel efectos farmacológicos relacionados con su actividad como antagonista de los receptores de adenosina.

Las funciones fundamentales y específicas de la adenosina en el SNC son dos, aunque en realidad están interrelacionadas: la neuroprotección y la neuromodulación. La neuroprotección ejercida por la adenosina en el SNC está asociada a su capacidad como regulador homeostático general, que inhibe la actividad metabólica. Está relacionada con la actividad neuromoduladora, puesto que la depresión metabólica que induce afecta a la liberación de neurotransmisores por parte de la célula. Esta actividad neuromoduladora, descrita en numerosas ocasiones (Cunha, 2001; Dunwiddie, 1980; Ginsborg and Hirst, 1972; Mitchell et al., 1993; Phillis et al., 1979; Ribeiro et al., 2002; Scholfield, 1978; Sebastiao and Ribeiro, 2009), puede dividirse en dos mecanismos:

a) Modulación sináptica y neuroprotección

Esta actividad está relacionada con la activación de vías de señalización celular mediada por el receptor de adenosina A₁. Este receptor se expresa en todo el cerebro y se activa en presencia de niveles basales de adenosina, reduciendo la excitabilidad neuronal (igual que en otros tejidos reduce la actividad metabólica como regulador homeostático). Inhibe, mediante la inactivación de los canales de calcio tipo N a nivel presináptico, la liberación de casi cualquier neurotransmisor, entre ellos el glutamato y la dopamina (potencialmente tóxicos) (Dunwiddie and Masino, 2001; Golembiowska and Zylewska, 1998; Li et al., 2001; MacDonald et al., 1986; Park et al., 2001; Popoli et al., 1995; Solinas et al., 2002). A nivel postsináptico reduce la sensibilidad de la membrana celular al inducir su hiperpolarización mediante la estimulación de los GIRKs (canales rectificadores de potasio acoplados a proteína G), que liberan potasio al exterior (figura 4, página 24) (Birnstiel et al., 1992; Dunwiddie and Masino, 2001; Luscher et al., 1997; Thompson et al., 1992). Este fenómeno ha sido relacionado con los efectos sedantes de la adenosina (Liu and Gao, 2007; Porkka-Heiskanen et al., 1997). Se ha propuesto que el efecto **neuroprotector** de la adenosina en el SNC podría estar relacionado con la activación de este receptor, dado que mejora la recuperación en modelos de isquemia e hipoxia (Hunter et al., 2003; Liu et al., 2005) y es capaz de prevenir ataques epilépticos en modelos murinos (Fedele et al., 2005; Fedele et al., 2006; Gouder et al., 2003). Además, su *knockeo* dificulta la recuperación tras la hipoxia, aumenta la sensibilidad al dolor y agrava la ansiedad (Johansson et al., 2001). Estas capacidades son promovidas por agonistas del A₁R y bloqueadas por sus antagonistas (Daval and Nicolas, 1994).

b) Modulación sináptica fina

Esta actividad es ejercida mediante la interacción con los receptores sinápticos para neurotransmisores como el glutamato o la dopamina. Como se comentaba en el apartado 1.2.1.b, los

a) Aumento de los niveles de adenosina

Una primera línea estratégica buscaría el aumento de los niveles de adenosina extracelular, aprovechando sus efectos neuroprotectores. Gracias a la existencia del transporte equilibrativo, el aumento de los niveles intracelulares de adenosina se traduce en un incremento en sus niveles extracelulares. El bloqueo de la AdK eleva los niveles de adenosina en el medio en modelos celulares y modelos animales de isquemia, epilepsia, dolor e inflamación, por lo que su uso en estos contextos podría ser beneficioso (Kowaluk and Jarvis, 2000). Otra forma de incrementar los niveles de adenosina es mediante el bloqueo de su transporte. De esta manera se impide la entrada del nucleósido al citoplasma pero no su formación extracelular, aumentando su concentración en el medio. Esta manipulación de los niveles de adenosina parece tener menos efectos secundarios que el uso de agonistas de los receptores de adenosina, que a menudo inducen bradicardia e hipotensión (Barraco and Phillis, 1991; Spremulli et al., 1983).

b) Estimulación o bloqueo de los receptores de adenosina

El aumento o la disminución de la expresión de los receptores son procesos característicos de determinadas neuropatologías con implicaciones que en algunos casos interesa paliar. Este hecho por sí solo los convierte en potenciales dianas terapéuticas. Este planteamiento se ve además reforzado por la capacidad de estos receptores de desencadenar respuestas neuroprotectoras o neurotóxicas, de modo que manipular su actividad abre una posibilidad para aprovechar estas propiedades. Si de lo que se trata es de aumentar o reducir la actividad de un receptor, hay diferentes abordajes técnicos que se pueden plantear:

Uso de agonistas o antagonistas específicos para cada receptor de adenosina

Hay un amplio catálogo de estas sustancias (Chen et al., 2013; Jacobson and Gao, 2006), de gran utilidad especialmente en el estudio de procesos en modelos animales. No obstante, su uso terapéutico en humanos plantea varios problemas. La especificidad de estas sustancias no es absoluta, de manera que por pequeñas que sean las afinidades que los otros receptores de adenosina tengan por ellas y lo controlada que sea la dosis, no puede descartarse que actúen sobre más de un tipo de receptor. Tampoco podemos saber el tipo celular sobre el que actúa, y dada la multifuncionalidad de la adenosina, es difícil asegurar si un efecto beneficioso, por ejemplo, se debe a la actuación de la molécula sobre los receptores de las neuronas pre o postsinápticas, de la glía, de células inflamatorias o de los capilares sanguíneos (Popoli et al., 2007).

Modulación de la expresión de los receptores

Reduciendo o aumentando los niveles de expresión de los receptores mediante control transcripcional estaríamos alterando su funcionalidad sin recurrir a agonistas o antagonistas. En cuanto a tratamientos terapéuticos, se trataría mayormente de estrategias en desarrollo, que implicarían terapias génicas o epigenéticas.

1.3 Caracterización del receptor de adenosina A_{2A}

1.3.1 El gen *ADORA2A*

El gen que codifica para el receptor de adenosina A_{2A} es *ADORA2A*. Su secuencia genómica se puede consultar en la base de datos del NCBI bajo la referencia NC_000022.10 Reference GRCh37.p13 Primary Assembly (24819565-24838328). Se localiza en el cromosoma 22, en la región 22q11.23 (Le et al., 1996; MacCollin et al., 1994; Yu et al., 2004). Está formado por tres exones, el primero de los cuales no es codificante y consta de seis isoformas: h1A, h1B, h1C, h1D, h1E y h1F (Yu et al., 2004). La más expresada en cerebro es la isoforma h1E (Yu et al., 2004). Este exón presenta una isla CpG cuyo grado de metilación es responsable de su expresión basal en distintas líneas celulares así como de su expresión tejido específica en el cerebro, como reflejan las diferencias entre el putamen y el cerebelo (Buirea et al., 2010a; Buirea et al., 2010b).

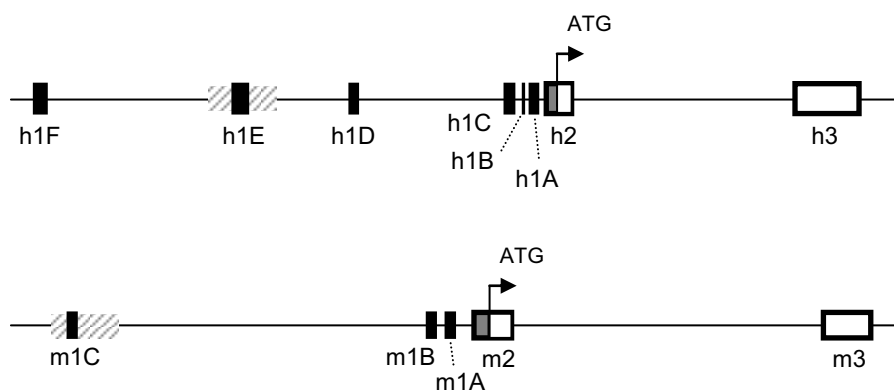


Figura 5. Representación gráfica del gen *ADORA2A* humano (arriba) y de ratón (abajo). Las cajas representan regiones exónicas. En negro, isoformas del exón 1, de la h1A a la h1F (en el caso del humano) y de la m1A a la m1C (en el caso del ratón). En blanco, región codificante (CDS). En gris, región no codificante del exón 2. Las zonas ralladas representan islas CpG importantes para la regulación transcripcional del gen en el cerebro.

El exón h1E tiene su homólogo en el ratón en el exón m1C, que también cuenta con una isla CpG en torno a él. El *ADORA2A* murino también tiene tres exones, el primero de los cuales no es codificante y consta de tres isoformas: m1A, m1B y m1C (figura 5, página 26).

1.3.2 Estructura de la proteína

Como otras GPCRs, el receptor de adenosina A_{2A} es una proteína con siete dominios transmembrana constituidos por hélices α , con el extremo -NH₂ en la cara extracelular y el -COOH en la intracelular. Como ilustra la figura 6, cuatro puentes disulfuro en la cara extracelular, que reorganizan ligeramente las hélices transmembrana, constituyen el sitio de unión al ligando (Jaakola et al., 2008).

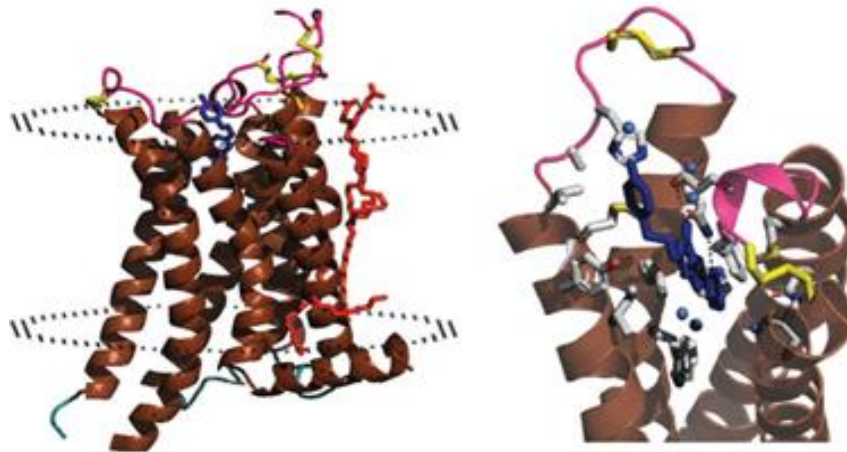


Figura 6. Estructura cristalográfica del A_{2A}R. Marrón: hélices α ; azul oscuro: ZM241385, antagonista del A_{2A}R; amarillo, puentes disulfuro; rosa, dominio extracelular; rojo, molécula de ácido estérico; azul claro, dominio intracelular. A la derecha, detalle del sitio de unión, en el que se muestran las hélices 3, 5, 6 y 7 implicadas. Las esferas azules representan moléculas de agua y se ve en detalle la estructura atómica de los aminoácidos implicados en la unión. (Fredholm et al., 2011)

1.3.3 Efectos de la activación del A_{2A}R

a) Neurotoxicidad

La activación del receptor A_{2A} ha sido relacionada con la toxicidad mediada por glutamato, neurotransmisor potencialmente tóxico (Corsi et al., 2000; Choi, 1992; Ferre et al., 2002; Li et al., 2001; Pintor et al., 2001; Popoli et al., 1995). La base de esta actividad es su capacidad de antagonizar los efectos del A₁R formando heterodímeros con él (ver capítulo 2, apartado 2.1.4). De

hecho el bloqueo del A_{2A}R refuerza la actividad neuroprotectora del A₁R y es beneficioso en diferentes modelos de daño celular debido a isquemia o de neuropatologías como la epilepsia o la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 1999; Monopoli et al., 1998; Popoli et al., 2002). En estos fenómenos podrían estar implicados también procesos inflamatorios y de regulación del flujo sanguíneo (Popoli et al., 2007).

b) Neuroprotección

Por otro lado, la señalización a través del A_{2A}R estimula la mielinización (Stevens et al., 2002) y es básica para la producción y efecto de determinados factores tróficos como el BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) (Lee and Chao, 2001; Tebano et al., 2008). Su activación puede reducir además los fenómenos proinflamatorios y la muerte celular que siguen a un evento hemorrágico en el cerebro (Mayne et al., 2001). El bloqueo del A_{2A}R agrava el daño producido por la activación de los receptores de glutamato del tipo NMDA (Robledo et al., 1999), por lo que el uso de agonistas del A_{2A}R a este nivel podría tener también efectos beneficiosos (Popoli et al., 2007).

1.3.4 Regulación de la actividad del receptor de adenosina A_{2A}

a) Regulación transcripcional

La expresión tejido específica del A_{2A}R en el cerebro es controlada por la metilación de su promotor, como demuestra la comparación de los perfiles de metilación y expresión del receptor entre el putamen y el cerebelo humanos y toda una serie de ensayos funcionales realizados en distintas líneas celulares. Los mismos estudios funcionales han identificado el factor de transcripción YY-1 como represor de la expresión del A_{2A}R y al ZBP-89 como activador. El papel del YY-1 fue confirmado además en el cerebelo humano (Buirea et al., 2010a; Buirea et al., 2010b).

a) Procesos de desensibilización y resensibilización

El estímulo que supone para el receptor la adición de un agonista es efectivo sólo durante un tiempo limitado, lo que puede tener implicaciones a la hora de diseñar un tratamiento. En general, los receptores acoplados a proteína G siguen este comportamiento, en un fenómeno que se denomina desensitización. La desensitización implica varios mecanismos. En primer lugar, la activación del receptor desencadena una señal mediante su disociación de la proteína G. Una vez liberada, el receptor no podrá ejercer su señalización hasta no estar de nuevo unido a una

proteína G, lo que limita su actividad. En segundo lugar, si son fosforilados, los receptores pueden ser internalizados en vesículas en el plazo de minutos, de modo que quedan aislados de cualquier posible señal activadora. A más largo plazo, y si el estímulo se mantiene, puede darse una reducción en la expresión del receptor.

La movilización de las vesículas de nuevo a la membrana recupera la funcionalidad del receptor. Este proceso se conoce como resensibilización (Barraco et al., 1995; Ferguson et al., 1998).

1.3.5 Distribución

La expresión del A_{2A}R es especialmente importante en los ganglios basales, aunque puede ser detectada en todo el cerebro. Además de las neuronas, las células del epitelio vascular y de la glía lo expresan, como mediador de respuestas de vasodilatación o diferenciación celular (Coney and Marshall, 1998; Mishina et al., 2007; Rosin et al., 1998; Stevens et al., 2002; Svenningsson et al., 1997; Svenningsson et al., 1999). Dentro de los ganglios basales, el órgano con mayor expresión del receptor es el estriado (figura 7). En esta región, la proteína G a la que se une es la Golf, y no la Ge como en otros tejidos. Estos dos fenómenos sugieren una función distintiva para el receptor en el estriado (Kull et al., 2000). Gran parte del receptor es intracelular, almacenado en vesículas, lo que puede indicar una elevada tasa de reemplazo del A_{2A}R o la existencia de una reserva disponible para su movilización en procesos de resensibilización. En primates se ha descrito que alrededor de un 3% del A_{2A}R localizado en la membrana aparece en el botón sináptico, siendo el resto extrasináptico (Bogenpohl et al., 2012; Brand et al., 2008). En el estriado, el A_{2A}R aparece no sólo en las neuronas propias de esta órgano, sino también en las terminales presinápticas (Bogenpohl et al., 2012; Ciruela et al., 2006).

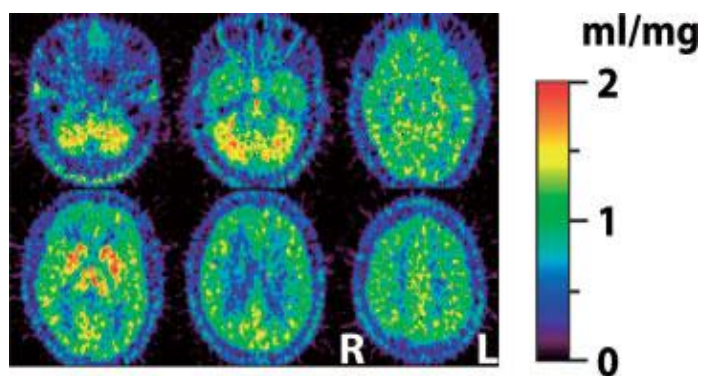


Figura 7. Distribución del A_{2A}R en el cerebro humano mediante tomografía de emisión por positrones del ligando [¹¹C]TMSX. La imagen incluye la señal de unión inespecífica del TMSX. La distribución muestra una mayor unión en el putamen, la cabeza del caudado y el tálamo, y menor en el córtex. (Mishina et al., 2007).

2. Los ganglios basales y el control motor

Hay varios órganos del SNC implicados en el control motor. Las interrelaciones que los conectan mediante conexiones sinápticas forman diferentes circuitos cuyo funcionamiento paralelo o secuencial permite la integración de la información y el procesado de una respuesta motora (Band and van Boxtel, 1999; Graybiel, 1997). Este trabajo abarca tan sólo el circuito formado por la corteza cerebral, los ganglios basales y el tálamo, que interviene en la selección y coordinación de patrones motores (Gerardin et al., 2004; Lehericy et al., 2004; Mink, 2003).

2.1 El circuito cortico-basal-talámico

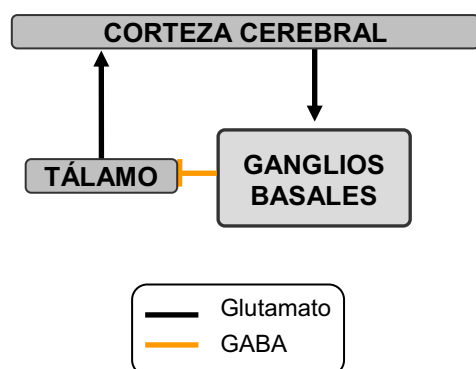


Figura 8. Esquema representativo del circuito corteza-ganglios basales-tálamo-corteza.

Los ganglios basales están funcionalmente interpuestos entre el córtex y el tálamo, de manera que procesan las señales procedentes de la corteza y las devuelven, a través del tálamo, de vuelta a la corteza, para modular la ejecución de los movimientos voluntarios (figura 8) (Albin et al., 1989; Alexander et al., 1990; Alexander et al., 1986; Blandini et al., 2000; DeLong, 1990). Se cierra así un circuito, un *loop* que relaciona las tres estructuras. En condiciones basales, la actividad del tálamo es inhibida tónicamente por la señal procedente de la estructura de salida de los ganglios basales, el complejo

formado por la sustancia negra reticulada y el globo pálido medio (SNr/GPm), cuyas terminales nerviosas segregan el neurotransmisor inhibitorio ácido γ -aminobutírico (GABA). En ausencia de estímulos, el tálamo permanece inhibido, por lo que el circuito no se cierra y no se produce movimiento (figura 10, página 34).

2.1.1 Los ganglios basales

Los ganglios basales son una serie de núcleos subcorticales interconectados situados en el telencéfalo: el estriado (dividido en caudado y putamen en humanos), el globo pálido (dividido en globo pálido medio y globo pálido lateral), la sustancia negra (dividida en partes reticulada y compacta), y el núcleo subtalámico (figura 9) (Blandini et al., 2000). Su actividad ha sido relacionada con la integración de información espacial, la volición y la coordinación motora, implicadas en conjunto en la selección de patrones motores que se ejecutan en las actividades rutinarias. El estriado puede dividirse en varias áreas topográficas que podrían estar especializadas en las diferentes tareas acometidas por los ganglios basales (figura 9). El putamen es la zona con una relación más estrecha con la función motora (Gerardin et al., 2004; Groenewegen, 2003; Lawrence et al., 1998; Lehericy et al., 2004; Vink et al., 2005; Yin and Knowlton, 2006).

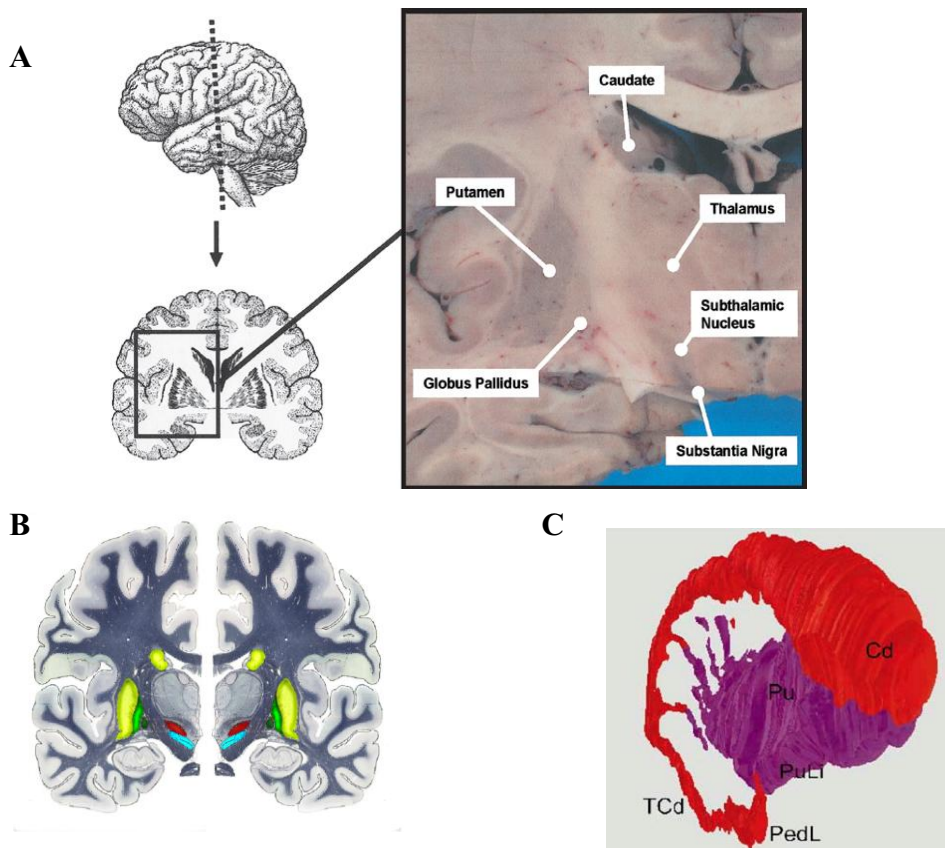


Figura 9. Posición anatómica de los ganglios basales y detalle del estriado. A: posición anatómica de los distintos núcleos de los ganglios basales en un corte coronal del cerebro humano. B: tinción con cristal violeta sobre la que se han resaltado en diferentes colores los componentes de los ganglios basales. Amarillo: caudado y putamen; verde: globo pálido medio y lateral; rojo: núcleo subtalámico; azul: sustancia negra. C: división anatómica del estriado, en putamen (violeta) y caudado (rojo). Adaptado de Burton et al., (2003) y <http://www.thehumanbrain.info/>.

2.1.2 Papel de la sustancia negra en el control motor

La visión actual de la función del circuito cortico-basal-talámico es la de seleccionar un patrón motor de entre todos los que el córtex elabora a partir de la información que nos rodea (Mink, 2003). Para ello, distintas áreas de la corteza cerebral envían terminales nerviosas excitadoras (glutamatérgicas) al estriado (McGeorge and Faull, 1989) y a la sustancia negra. La sustancia negra está compuesta por dos regiones, la sustancia negra compacta (SNc) y la sustancia negra reticulada (SNr). La SNr conforma, junto con el globo pálido medio (GPm), una estructura funcional que envía terminales GABAérgicos al tálamo inhibiéndolo de forma tónica. La activación de la SNc es de gran importancia, ya que está compuesto por células dopaminérgicas que inervan el estriado modulando su actividad. Los efectos moduladores de la dopamina sobre la actividad estriatal promueven la actividad motora, como veremos a continuación

2.1.3 Papel del estriado en el control motor

Los modelos de funcionamiento de los ganglios basales (Albin et al., 1989; Alexander et al., 1990; Alexander et al., 1986; Blandini et al., 2000; DeLong, 1990) proponen la existencia dentro de esta estructura de un doble circuito que se origina en el órgano de entrada de la señal sináptica a los ganglios basales, el estriado. El estriado está formado en un 95% por neuronas espinosas medianas GABAérgicas (Kemp, 1968; Kemp and Powell, 1971) que pueden subdividirse en dos poblaciones diferenciadas por un perfil característico de expresión proteica y una división funcional fundamental para el control motor:

- Las neuronas de la vía directa (que desinhibe el tálamo iniciando el movimiento). Las neuronas que la componen expresan preferentemente receptores de dopamina D₁, receptores de adenosina A₁, sustancia P y dinorfina. Inervan e inhiben (puesto que son GABAérgicas) directamente la vía de salida de señal de los ganglios basales (SNr/GPm). Al reducirse la inhibición talámica, el circuito cortico-basal-talámico se cierra, de manera que la señal sináptica es devuelta a la corteza y se inicia el movimiento (figura 10, página 34).
- Las neuronas de la vía indirecta (refuerza la inhibición del tálamo, y con ella la represión motora). Las neuronas que la componen expresan preferentemente receptores de dopamina D₂, receptores de adenosina A_{2A} y encefalina. Inervan e inhiben el globo pálido medio, que a su vez inhibe la vía de salida de señal de los ganglios basales (SNr/GPm). Por tanto su actividad refuerza la inhibición talámica impidiendo el movimiento (figura 10, página 34).

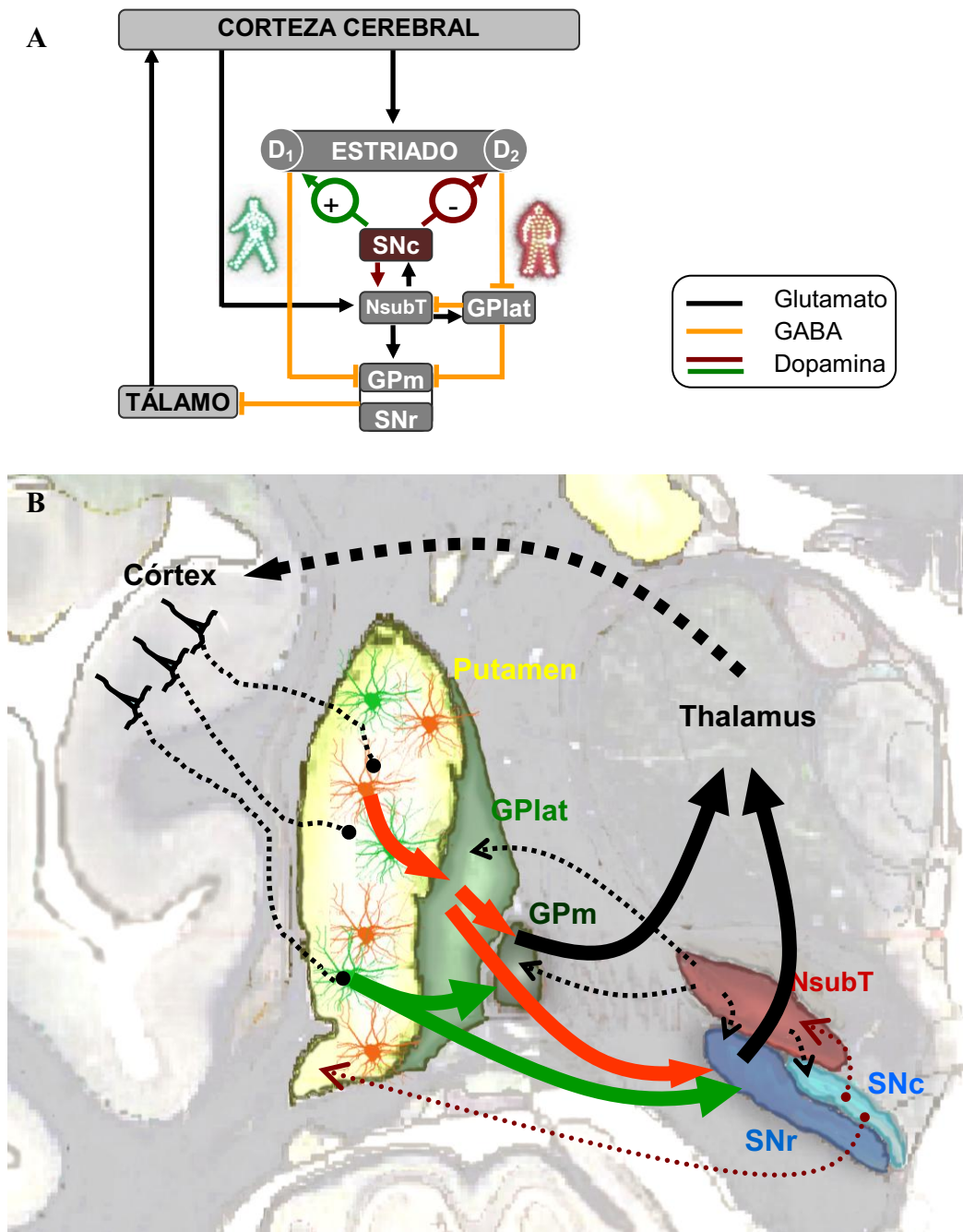


Figura 10. Circuito cortico-basal-talámico en detalle, indicando la segregación de las vías directa e indirecta. A: representación esquemática de la organización funcional del circuito de los ganglios basales. Resaltada con el muñeco verde, la vía directa (activadora). Resaltada con el rojo, la vía indirecta (inhibidora). D₁, D₂: receptores de dopamina D₁ y D₂. El tipo de neurotransmisor se indica mediante el color de las flechas. El glutamato excita las terminales sinápticas, mientras que el GABA es una señal inhibidora de la transmisión. B: esquema de las mismas conexiones sobre una tinción con cristal violeta de una sección coronal de cerebro. Las flechas verdes corresponden a la vía directa, mientras las naranjas indican la vía indirecta. SNc: sustancia negra compacta, NsubT: núcleo subtalámico, GPlat: globo pálido lateral, GPm: globo pálido medio, SNr: sustancia negra reticulada.

Adaptado de Blandini et al., (2000), y <http://www.thehumanbrain.info/>.

Cada vía reacciona de manera diferente al recibir la señal dopaminérgica, puesto que los receptores de dopamina están segregados y tienen efectos opuestos en su interacción con la AC (Gerfen, 2000; Stoof and Keibian, 1981). La dopamina activa la vía directa e inhibe la indirecta. Esta descompensación entre las dos vías lleva a una reducción de la inhibición talámica que permite que el ciclo corteza-ganglios basales-tálamo se cierre y se produzca el movimiento. Por tanto, y según el modelo, del balance entre la actividad de las dos vías depende que el movimiento se inicie o no (Gerfen and Surmeier, 2011). Esto sitúa al estriado en una posición fundamental en lo referente al control de los movimientos voluntarios.

2.1.4 Relevancia del A_{2A}R en el control motor

a) El dímero A_{2A}R-D₂R

La relevancia del A_{2A}R en el control motor deriva de su distribución en el cerebro y de su relación con el receptor de dopamina D₂ (D₂R). La expresión del A_{2A}R está concentrada en las neuronas GABAérgicas medianas espinosas de la vía indirecta, que expresan a su vez el D₂R. El correcto funcionamiento de la señal dopaminérgica que alcanza estas células es fundamental para el control motor, como se ha señalado. La formación de heterodímeros entre el A_{2A}R y el D₂R en sus membranas afecta a la eficacia de la transmisión dopaminérgica.

La interacción entre el A_{2A}R y el D₂R (Ferre et al., 2008) tiene un efecto inhibitorio recíproco. Cuando se unen a su ligando específico, los receptores de dopamina D₂ inhiben a los de adenosina A_{2A}, y viceversa. Hay dos tipos de interacción, que además difieren en cuanto al fenómeno que modulan:

1. Efecto antagónico de la activación del A_{2A}R y del D₂R sobre la AC: los receptores de dopamina, como los de adenosina, se acoplan a proteína G. El D₂R se une a la proteína G_{i/o}, inhibiendo la AC. Es decir, contrarresta el efecto que la activación del A_{2A}R tiene sobre la vía del AMPc. Este fenómeno no requiere la formación del dímero.
2. Inhibición de la unión del D₂R a su ligando por activación del A_{2A}R: cuando el D₂R forma heterodímeros con el A_{2A}R, se une a la G_{q/11}. En este caso la unión del receptor a la dopamina activa la PLC, induciendo un descenso en la excitabilidad neuronal y en la liberación de neurotransmisores. Este efecto se mitiga con la activación del A_{2A}R implicado en el heterodímero, pues reduce la afinidad del D₂R por su ligando. Este tipo de interacción, que implica la heterodimerización, se denomina intramembrana. Las metilxantinas, antagonistas del A_{2A}R, tienen el mismo efecto que los agonistas del D₂R (Fuxe and Ungerstedt, 1974). Por

lo tanto, la señalización de la adenosina a través del A_{2A}R es capaz de modular la señalización dopaminérgica en el estriado (Ferre et al., 2008; Ferre et al., 1993).

b) El dímero A_{2A}R-A₁R

En el estriado este dímero se forma en la membrana presináptica. En la postsináptica no es relevante, puesto que su expresión está segregada: las neuronas de la vía directa expresan el A₁R, y las de la indirecta el A_{2A}R. Como en el caso del dímero A_{2A}R-D₂R, el efecto es antagónico. En condiciones basales, el receptor activo es el A₁. Cuando los niveles de adenosina aumentan, el receptor con más afinidad pasa a ser el A_{2A}, que al activarse dentro del dímero inhibe la actividad del A₁R. Como consecuencia se pierde la actividad neuroprotectora, promoviéndose la liberación de glutamato o la dopamina y activando la AC (figura 11) (Ciruela et al., 2006; Dunwiddie and Masino, 2001; Golembiowska and Zylewska, 1998; Li et al., 2001; Popoli et al., 1995; Solinas et al., 2002). El bloqueo del A_{2A}R refuerza esta actividad neuroprotectora del A₁R y es beneficioso en diferentes modelos de daño celular debido a isquemia o de neuropatologías como la epilepsia o la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 1999; Monopoli et al., 1998; Popoli et al., 2002). Esta inducción de la excitabilidad neuronal mediante el bloqueo del A₁R es la base de la actividad neurotóxica del A_{2A}R.

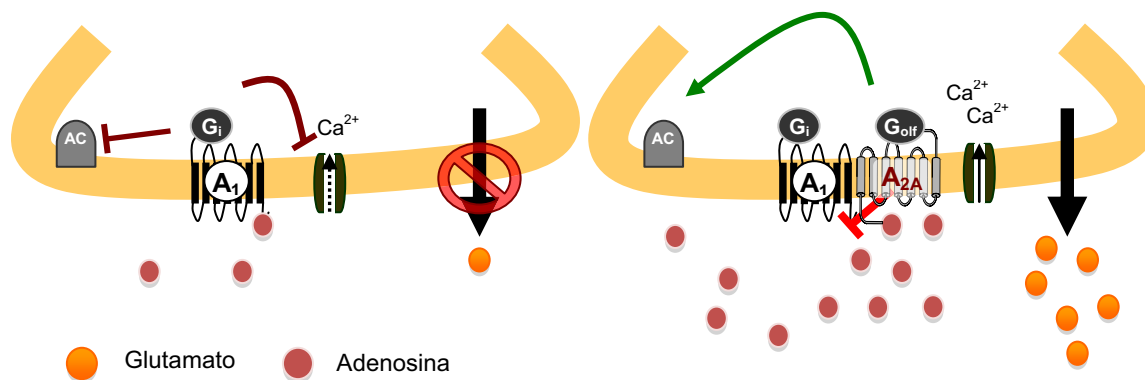


Figura 11. Efecto del aumento en los niveles de adenosina en la actividad de los receptores A₁ y A_{2A}. A la izquierda, con bajos niveles de adenosina, el A₁R limita la liberación de neurotransmisores como el glutamato. A la derecha, el A_{2A}R, que forma heterodímeros con el A₁R, se activa con el aumento de los niveles de adenosina en el medio. Como consecuencia, inhibe la actividad neuroprotectora del A₁R.

2.1.5 Evidencias de la relevancia del A_{2A}R en el control motor

Según el modelo que estamos describiendo la adenosina es capaz de modular la actividad motora gracias a su capacidad de interferir en la señalización dopaminérgica. Un incremento en los niveles de adenosina tendría como consecuencia una inhibición motora: los receptores de do-

pamina implicados en los heterodímeros perderían afinidad por su ligando, de manera que la señal dopaminérgica vería reducida su eficacia. La vía directa no se activaría, y la indirecta permanecería tónicamente activada. Como consecuencia, la actividad motora disminuiría. Y al revés, una reducción de los niveles de adenosina tendría como consecuencia un incremento de la actividad motora, como el inducido por el consumo de agonistas de los receptores de dopamina. Existen varias evidencias que apoyan este modelo:

a) Efecto de los agonistas y antagonistas del A_{2A}R en humanos y animales.

La actividad locomotora se ve aumentada por el consumo de antagonistas de A_{2A} (Boissier and Simon, 1965; El Yacoubi et al., 2000). Esto está ampliamente descrito y aceptado, formando parte prácticamente del saber popular si consideramos que la cafeína y la teofilina, antagonistas inespecíficos de los receptores de adenosina, son sustancias cuyo consumo está muy extendido en muchas culturas. Los agonistas del receptor, en cambio, tienen actividad sedante (figura 12, página 38) (Mingote et al., 2008). Además, la hiperlocomoción inducida por los agonistas de los receptores de dopamina se ve atenuada por los agonistas de A_{2A} y de A₁, y exacerbada por sus antagonistas (Boison et al., 2012; Popoli et al., 1996; Popoli et al., 1994).

b) Efectos de la manipulación de los niveles del A_{2A}R en modelos murinos.

1. Los ratones Adktml^{-/-}Tg (UbiAdk) tienen una expresión más elevada de la Adk de lo normal, lo que les induce una deficiencia global en los niveles de adenosina en el cerebro. Estos ratones, sin ligando para los receptores de adenosina, muestran hiperactividad locomotora al exponerlos a un espacio nuevo (Fedele et al., 2005).

2. El *knockeo* tejido específico del A_{2A}R estriatal (ratones Dlx5/6-Cre(+)^{A_{2A}R^{flox+/+}}) agrava la hiperlocomoción inducida por los agonistas del D₂R. Este fenómeno se atribuye a la pérdida, en estos ratones, del bloqueo que el A_{2A}R ejerce sobre el D₂R en el estriado. Además, los antagonistas del A_{2A}R, que aumentan la actividad motora, carecen de efecto en estos ratones, reforzando la especificidad del efecto de estas sustancias. Este tratamiento tiene como diana en este modelo exclusivamente los A_{2A}R extraestriatales y/o presinápticos (Shen et al., 2008).

3. Cuando el *knockeo* afecta a una región más amplia, como en el caso de los ratones CaMKIIα-Cre(+)^{A_{2A}R^{flox+/+}}, en los que el A_{2A}R no se expresa en el cerebro, el efecto de los antagonistas del D₂R se ve, por el contrario, atenuado. Este hecho sugiere un papel diferente para los A_{2A}R extraestriatales y/o los estriatales presinápticos del que tienen los expresados en el estriado en relación a la regulación de la respuesta a esas sustancias (Shen et al., 2008).

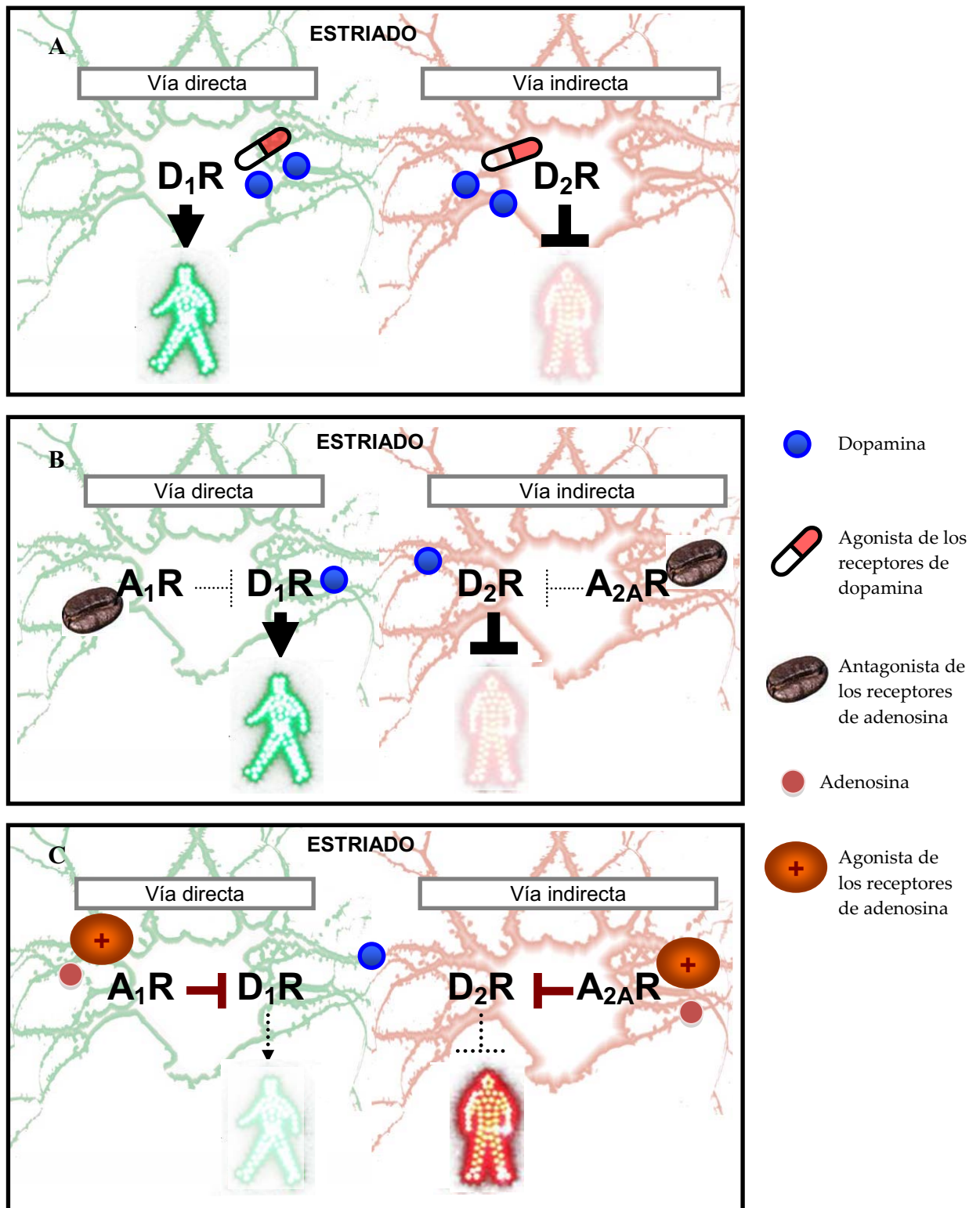


Figura 12. Representación esquemática del modelo según el cual los receptores de adenosina modulan el movimiento gracias a su interacción con los receptores de dopamina en el estriado. A: la dopamina activa la vía directa e inhibe la indirecta, facilitando el inicio del movimiento. B: tanto los agonistas de los receptores de dopamina como los antagonistas de los receptores de adenosina (como el café, por ejemplo) inducen actividad motora. C: a su vez, los agonistas de los receptores de adenosina tienen efecto sedante.

4. Siguiendo la lógica del modelo, la sobreexpresión del receptor A_{2A} en el cerebro podría reducir la actividad motora. Sin embargo, ratas manipuladas para sobreexpresar el receptor en el cerebro no presentan síntomas motores (Gimenez-Llort et al., 2007). Considerando el punto anterior, quizá habría de comprobarse en un modelo con una sobreexpresión del receptor focalizada en el estriado.

5. Los ratones Adk-tg, con una elevada actividad de la adenosín quinasa en el cerebro, presentan hiperlocomoción y síntomas psicóticos como los inducidos por agonistas de los receptores de dopamina o antagonistas de los de glutamato. La implantación de injertos que liberan adenosina en el estriado de estos ratones recupera el fenotipo normal (Shen et al., 2012).

c) Disfunción de los ganglios basales en contextos neuropatológicos

Las alteraciones del correcto funcionamiento del circuito cortico-estriatal tienen implicaciones motoras. Existen patologías neurodegenerativas que, afectando a alguno de los eslabones de los ganglios basales, se caracterizan fundamentalmente por el trastorno motor que aparece a medida que el proceso degenerativo avanza. La enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington son paradigmáticas en cuanto a sus síntomas motores. En ambas, la expresión del A_{2A}R está alterada, como veremos más adelante.

3. Enfermedades neurológicas con trastorno motor asociado tratadas en este trabajo

3.1 *La enfermedad de Parkinson*

La enfermedad de Parkinson (EP) constituye la segunda afección neurodegenerativa más frecuente superada sólo por el Alzheimer. Su prevalencia ronda el 0,5-1% entre personas de 65 a 69 años, aumentando hasta el 1-3% a partir de los 80 años (Nussbaum and Ellis, 2003). Su aparición antes de los 50 es rara, y su prevalencia aumenta con la edad, lo que la relaciona claramente con el envejecimiento. El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados hará por tanto que su incidencia aumente en las próximas décadas (de Lau and Breteler, 2006; Pezzoli and Zini, 2010). La neurodegeneración característica de la EP afecta sobre todo a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra compacta, de manera que la dopamina que normalmente alcanza el estriado disminuye. Esto altera el normal funcionamiento de los ganglios basales dando lugar a una sintomatología motora de tipo hipocinético. El 10% de los casos de EP son de tipo familiar, asociados a mutaciones en determinados genes que han abierto nuevas vías de investigación relativas a la posible etiología de la enfermedad (ver tabla 2, página 42).

3.1.1 Las alteraciones motoras en la enfermedad de Parkinson

La EP es el ejemplo paradigmático de trastorno hipocinético asociado a una disfunción de los ganglios basales. No obstante, existen también alteraciones motoras hipercinéticas ligadas a esta enfermedad que se desarrollan como efecto secundario del tratamiento con levodopa, un sustituto de la dopamina cuya administración representa la estrategia terapéutica más común en la EP. Es decir, las personas con EP pueden presentar un cuadro motor complejo, resultado de los síntomas propios de la enfermedad (parkinsonismo) y los efectos secundarios del tratamiento (discinesias).

<i>Ref</i>	<i>Gen</i>	<i>Relación con la EP, heredabilidad</i>	<i>Referencias</i>
PARK1=PARK4	SNCA (α -sinucleína)	Causa de EP, autosómica dominante	(Kruger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997)
PARK2	PRKN (Parkina)	Causa de EP juvenil, autosómica recesiva	(Kitada et al., 1998)
PARK3	FBXO48 (Proteína F-box 48)	Escasa relación con la EP	(Xiu et al., 2013)
PARK5	UCHL1 (Ubiquitín carboxilo-terminal hidrolasa L1)	Asociación incierta, descrita en una familia que presenta LB. Autosómica dominante	(Leroy et al., 1998)
PARK6	PINK1 (Quinasa inducible por PTEN 1)	Asociada a EP juvenil, autosómica recesiva	(Valente et al., 2004)
PARK7	DJ-1 (Proteína de la EP 7)	Causa de EP, autosómica recesiva	(Bonifati et al., 2003)
PARK8	LRRK2 (Quinasa rica en leucina 2)	Causa de EP, autosómica dominante	(Zimprich et al., 2004)
PARK9	ATP13A2 (ATPasa 13A2)	Causa el síndrome Kufor-Rakeb, asociación con EP no demostrada	(Chan et al., 2013)
PARK10	Cromosoma 1p34-p32	Región de riesgo, pero no se ha demostrado la relación	(Wan et al., 2014)
PARK11	GIGYF2 (proteína de interacción con Grb10)	Podría representar un factor de riesgo para la EP, autosómica dominante	(Wang et al., 2011)
PARK12	ATP1B4 (Subunidad β 4 de la bomba sodio/potasio)	No se ha demostrado que sea un factor de riesgo para la EP	(Gao et al., 2014)
PARK13	HTRA2 (serina peptidasa HtrA2 mitocondrial)	No se ha demostrado que sea un factor de riesgo para la EP	(Kruger et al., 2011)
PARK14	PLA2G6 (Fosfolipasa A2 independiente de calcio)	Podría ser causativa de un pequeño porcentaje de casos de EP, autosómica recesiva	(Gui et al., 2013)
PARK15	FBXO7 (Proteína F-box 7)	Causa de EP juvenil, autosómica recesiva	(Di Fonzo et al., 2009)

Tabla 2. Parte de las mutaciones que han sido relacionadas con el riesgo o el desarrollo de formas familiares de EP. Como se puede ver en la tabla, no todas han sido confirmadas.

a) Parkinsonismo

A menudo se emplea parkinsonismo como sinónimo de trastorno hipocinético. Por parkinsonismo se entiende una combinación de síntomas que incluyen temblor en reposo, rigidez, bradicinesia (ralentización motora) y fallo de los reflejos posturales. Estos síntomas principales

suelen ir acompañados por otros, de tipo motor (como la congelación durante la marcha) o no (como demencia, depresión o frecuentes constipados). La principal causa de parkinsonismo es la enfermedad de Parkinson, pero su origen puede también ser secundario a otras patologías como la hidrocefalia, la aparición de tumores o las alteraciones vasculares. El parkinsonismo puede tener además origen psicogénico, o estar inducido por fármacos que bloquean los receptores de dopamina o promueven su degradación (ver apartado 3.3.1) o por intoxicación (por ejemplo, debida al consumo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, más conocido como MPTP).

b) Discinesias

Las discinesias son alteraciones motoras frecuentes en la EP. Consisten en patrones motores hiperkinéticos que aparecen como consecuencia del tratamiento con levodopa. Consisten en movimientos involuntarios de tipo distonía o corea (contracciones involuntarias del músculo, sostenidas en el primer caso y repentinas e irregulares en el segundo), que normalmente se dan durante el pico de la dosis de levodopa.

3.1.2 Clínica

a) Sintomatología

La EP es en realidad un trastorno sistémico en el que la sintomatología motora, de aparecer, es precedida por toda una serie de signos no motores, que afectan al olfato, el sueño o las funciones mentales (Ferrer et al., 2012). No obstante, los rasgos clínicos más característicos de la EP siguen siendo síntomas motores como la presencia de temblor en reposo, rigidez, bradicinesia e inestabilidad postural. El parkinsonismo es un síndrome que puede aparecer también en otros contextos patológicos, por lo que para diagnosticar una EP se considera necesario presentar al menos dos de estos síntomas, excluir posibles causas de parkinsonismo secundario (el provocado por determinados tratamientos) y presentar una buena respuesta de los síntomas al tratamiento clásico anti-parkinsoniano, la levodopa (Litvan et al., 2003). Los síntomas no aparecen hasta que la neurodegeneración está relativamente avanzada, cuando la muerte neuronal afecta al 60% de las células de la sustancia negra y se ha perdido un 80% de la dopamina (Fearnley and Lees, 1991). En realidad, el daño no afecta en exclusiva al sistema dopaminérgico. La degeneración de la sustancia negra va siempre acompañada de una extensa patología asociada fuera de esta región, que afecta al sistema límbico, la corteza y el sistema autónomo (Braak and Braak, 2000). Esto está relacionado con los síntomas no motores como la demencia o el deterioro cognitivo (Pezzoli and Zini, 2010).

b) Diagnóstico

El diagnóstico clínico no es definitivo y sólo el análisis postmortem permite la categorización definitiva de la enfermedad. El rasgo neuropatológico definitorio de la EP es la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteicas aberrantes, denominadas cuerpos de Lewy (LB) o neuritas de Lewy, según tengan forma globular o fibrilar (Braak et al., 2003). Aunque no se sabe exactamente cómo, estas inclusiones están relacionadas con la muerte neuronal y aparecen ya en etapas presintomáticas. En función de la topografía de las inclusiones el diagnóstico neuropatológico postmortem clasifica la enfermedad en seis estadios, que van del 1 al 6. La sintomatología aparece a partir del estadio 3 (figura 13) (Braak et al., 2003).

Los LB consisten en agregados insolubles compuestos fundamentalmente por α -sinucleína (Baba et al., 1998; Duda et al., 2000; Irizarry et al., 1998), aunque también contienen proteínas fosforiladas y ubiquitina (Spillantini et al., 1997). La α -sinucleína es una proteína sináptica implicada en la regulación de la movilización de vesículas sinápticas en las terminales nerviosas (Cabin et al., 2002). Su relevancia en la EP está bien fundada por el descubrimiento de ciertas mutaciones en su gen asociadas a formas de EP familiar (ver tabla 2, página 42). La ubiquitina, por su parte, es una proteína que se conjuga con otras constituyendo una marca par su degradación por el proteasoma (Ciechanover, 1993). La degradación de la α -sinucleína, llevada a cabo por el proteasoma, ocurre mucho más lentamente en el caso de una forma mutada como la A53T, relacionada con la enfermedad. Este fenómeno podría constituir una explicación de la acumulación de agregados de la proteína en las formas familiares de la EP. Además, otras formas de EP familiar están asociadas a mutaciones que afectan al sistema ubiquitina-proteasoma (ver tabla 2, página 42) (Chung et al., 2001; Shimura et al., 2000).

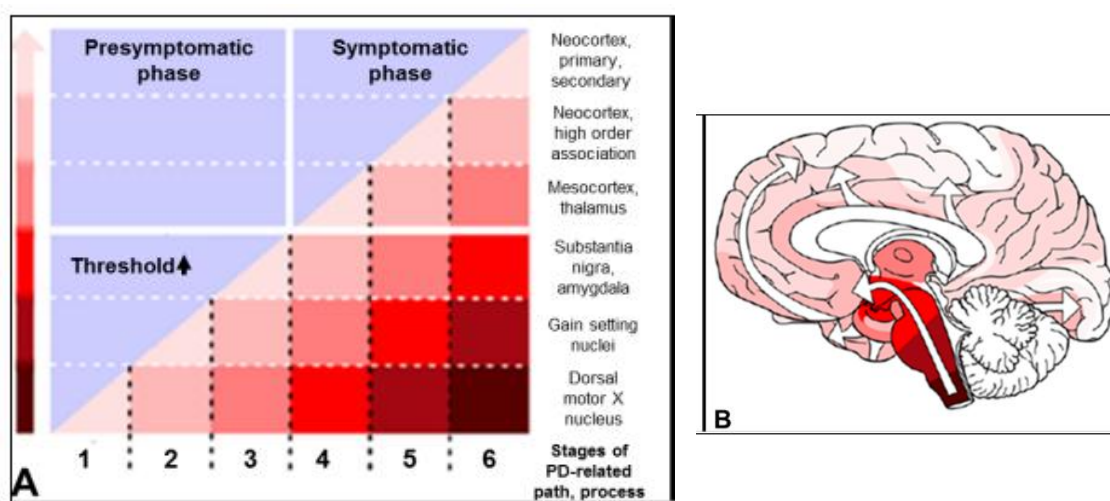


Figura 13. Progresión topográfica de la aparición de LB en la EP a medida que avanza la patología.

(Braak et al., 2003)

3.1.3 Etiología

La EP es en realidad una enfermedad sistémica, en la que el daño celular, que no se restringe a la sustancia negra, se debe a la confluencia de distintos fenómenos patológicos. La formación de LB correlaciona sólo hasta cierto punto con la clínica y la muerte neuronal, dejando un papel relevante también a la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, las modificaciones proteicas postraduccionales o la alteración del sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia. En conjunto, puede hablarse de una actividad celular subóptima que acaba conduciendo a la muerte de la neurona (Ferrer et al., 2012).

Hay varias teorías para explicar la etiología de la enfermedad. La ausencia de causas genéticas evidentes en la mayoría de los casos esporádicos, la existencia de variaciones interculturales observadas en su prevalencia (de Lau and Breteler, 2006) y la relación observada entre la exposición a diferentes tóxicos y aparición de la enfermedad (Semchuk et al., 1992) justifican la sugerencia de los mecanismos epigenéticos como posibles interventores en la aparición y desarrollo de la enfermedad.

En cualquier caso, hay tres procesos fundamentales que ocurren de manera relacionada: la agregación de la α -sinucleína, la pérdida de efectividad del proteasoma y la disfunción mitocondrial.

- **Agregación de α -sinucleína:** la hipótesis de la agregación proteica como mecanismo de protección celular frente a especies solubles tóxicas en enfermedades neurodegenerativas ha sido propuesta para los LB (Ross and Poirier, 2005). No obstante, existen trabajos que apuntan más bien hacia su toxicidad (Wan and Chung, 2012). La mutación de la α -sinucleína puede ser causa primaria de la enfermedad, pues existen formas de EP familiar provocadas por mutaciones en su gen (PARK1 y PARK4). Las formas mutadas alteran la funcionalidad del sistema ubiquitina proteasoma (UPS) y de la mitocondria (Stefanis et al., 2001; Tanaka et al., 2001). Se ha escrito cómo los agregados proteicos pueden inhibir el proteasoma mediante saturación de las chaperonas necesarias para su funcionamiento o por interacción directa (Bence et al., 2001). Además, la sobreexpresión de α -sinucleína afecta negativamente a la función mitocondrial (Hsu et al., 2000).
- **Disfunción del proteasoma:** varias formas de EP familiar están provocadas por mutaciones en genes de proteínas que forman parte del UPS, como PARK2 o PARK5. El mal funcionamiento del proteasoma como desencadenante de los procesos que conducen finalmente a la muerte celular se ve apoyado por evidencias experimentales realizadas *in vivo* que muestran

cómo su inhibición lleva a la formación de agregados de α -sinucleína y a disfunción mitocondrial (Fornai et al., 2003; McNaught et al., 2002). Que la α -sinucleína sea un componente mayoritario de los LB parece sugerir que el proteasoma no es capaz de procesar correctamente la degradación de las proteínas que los conforman.

- **Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial:** el papel que la disfunción mitocondrial podría tener en la EP se reforzó con el descubrimiento del efecto que la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) tiene en humanos (Langston et al., 1983), primates no humanos y ratones (Beal, 2001). Esta sustancia inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, e induce parkinsonismo (Tipton and Singer, 1993). Además, la inyección de rotenona (otro inhibidor del complejo I), reproduce varias características de la enfermedad, incluida la aparición de LB. El estrés oxidativo es característico de individuos con EP, incluso en etapas presintomáticas (Dexter et al., 1994). Las mitocondrias aparecen a menudo contenidas en los LB (Gai et al., 2000), y su disfunción podría estar implicada en las alteraciones del proteasoma y la acumulación de agregados de α -sinucleína (Fornai et al., 2005).

3.1.4 El receptor de adenosina A_{2A} en la enfermedad de Parkinson

El receptor A_{2A} está patológicamente sobreexpresado en el putamen de los pacientes de EP (Calon et al., 2004). El efecto inhibitorio que el A_{2A}R tiene sobre el D₂R agrava así los efectos de la disminución de la señalización dopaminérgica en esta enfermedad. Este aumento del receptor, constatado también en linfocitos circulantes, correlaciona con la severidad del trastorno motor (Casetta et al., 2013; Varani et al., 2010) y proporciona una interesante diana terapéutica en esta enfermedad, puesto que el bloqueo del A_{2A}R puede rescatar la funcionalidad del D₂R. Se trataría de una estrategia paliativa, pero de gran utilidad si permitiera reducir las dosis empleadas de levodopa, el fármaco más ampliamente utilizado en el tratamiento de la EP (figura 14, página 47). Esta droga, que sustituye a la dopamina, induce a largo plazo la aparición de síntomas secundarios como las discinesias (Obeso et al., 2000a; Obeso et al., 2000b; Rajput et al., 2002). La istradefilina, un antagonista del A_{2A}R, ha sido ya ensayada en fase clínica como complemento de la L-dopa (Bara-Jimenez et al., 2003; Hauser et al., 2008; LeWitt et al., 2008; Mizuno and Kondo, 2013; Stacy et al., 2008). Otra posibilidad, si se considera la hipometilación del A_{2A}R en el estriado y su sensibilidad *in vitro* a tratamientos metilantes y desmetilantes (Buirea et al., 2010a; Buirea et al., 2010b), sería el tratamiento adyuvante con S-adenosil metionina (SAM) (Barrachina et al., 2011). El SAM, donador habitual de grupos metilo en el organismo, está redu-

cido en los individuos afectados por EP debido al consumo de levodopa, que lo degrada (Cheng et al., 1997; De Bonis et al., 2010; Muller et al., 2001; Obeid et al., 2007; Zoccolella et al., 2009). Aunque adolece de falta de especificidad como cualquier estrategia terapéutica basada en la epigenética hasta ahora, ha sido usado en ensayos en fase clínica para el tratamiento de la depresión sin efectos secundarios (Bottiglieri et al., 1990; Di Rocco et al., 2000; Papakostas, 2009).

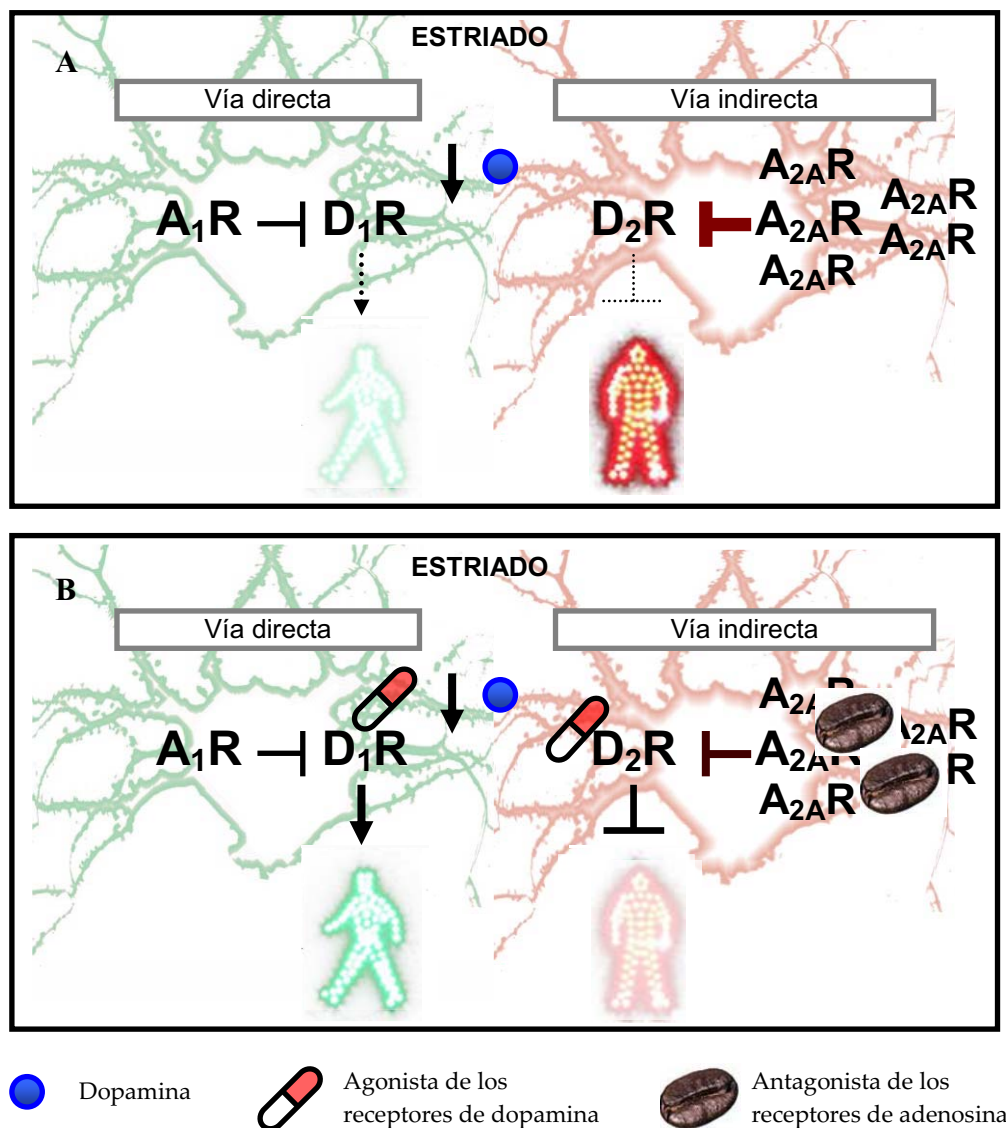


Figura 14. Relevancia del A₂AR estriatal en la etiología de la enfermedad de Parkinson. A: sobreexpresión patológica del A₂AR en la EP, que agrava la reducción de la señal dopaminérgica en el estriado debida a la muerte neuronal en la sustancia negra. Como consecuencia, la vía indirecta no se ve bloqueada, mientras que la directa es hipofuncional. B: efecto de los tratamientos para la EP. La L-dopa sustituye la dopamina, estimulando la actividad de los receptores D₁ y D₂. Así se activa la vía directa y se inhibe la indirecta, promoviendo el movimiento. Los antagonistas del A₂AR contribuyen por su parte rescatando la sensibilidad del D₂R a la señal.

3.2 La enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden genético autosómico dominante caracterizado por el desarrollo progresivo de problemas motores, alteraciones psiquiátricas y declive cognitivo. Este conjunto de síntomas se debe a un proceso neurodegenerativo de muerte neuronal selectiva y astrogliosis que afecta sobre todo a estriado y córtex, aunque hay una reducción general en el tamaño del cerebro de los enfermos (de la Monte et al., 1988). Suele aparecer en la madurez (a partir de los cuarenta, cincuenta años), existiendo formas tempranas que pueden manifestarse ya en la infancia. La enfermedad progresa durante quince o veinte años hasta conducir, inexorablemente, a la muerte.

3.2.1 Las alteraciones motoras en la enfermedad de Huntington

La EH constituye un ejemplo paradigmático de trastorno hiperkinético asociado a una disfunción de los ganglios basales. La corea es su alteración motora más característica, aunque este trastorno motor puede tener otras causas (por ejemplo, un daño tisular en el estriado debido a una lesión o a la aparición de un tumor). Se trata de un movimiento involuntario irregular rápido, puntual, no rítmico que fluye de una zona del cuerpo a otra. Además, en la EH pueden darse también otros trastornos motores, como la distonía (contracción involuntaria sostenida de un músculo, que conlleva una postura forzada), los tics o la inestabilidad postural debida a sacudidas musculares (ver tabla 3). Los neurolépticos han sido empleados en el tratamiento de la EH. Entre estos fármacos hay muchos que bloquean el receptor de dopamina D₂, y que han sido relacionados con el desarrollo de discinesias tardías (ver tabla 4, capítulo 3.3.1, página 53).

	Rítmico	Repetición de la postura	Movimiento estereotipado	Supresibilidad
Corea	No	No	Raramente	No
Distonía	Raramente	Sí	A veces	Parcial y limitada en el tiempo
Tics	No	Sí	Sí	Generalmente sí

Tabla 3. Trastornos hiperkinéticos comunes en la EH. En las columnas de la derecha se indican las características de los movimientos anormales que permiten clasificar el trastorno en uno u otro tipo. Adaptado de Sanger et al., (2010).

3.2.2 Clínica

El proceso neurodegenerativo afecta principalmente a las neuronas GABAérgicas del estriado, mostrando una sensibilidad mayor y más temprana las que contienen encefalina y expresan preferentemente los receptores de adenosina A_{2A} y de dopamina D₂ (Glass et al., 2000; Reiner et al., 1988). La enfermedad se divide a efectos clínicos en cinco estadios que van del 0 al 4. Esta clasificación considera el aspecto macroscópico del cerebro y el avance de la pérdida neuronal y la astrogliosis evaluados mediante recuento celular efectuado en el caudado (Vonsattel et al., 1985). En fase 0, el cerebro es macroscópicamente normal y la pérdida neuronal es inferior al 40%, sin astrocitosis. A partir del grado 1, la astrocitosis empieza a aparecer en el caudado y el putamen y la pérdida neuronal ronda el 50%. En la última fase, el cerebro está claramente atrofiado, la astrocitosis es generalizada y la pérdida neuronal en el caudado supera el 90% (Hodges et al., 2006). En las fases más avanzadas, a menudo se da también afectación cortical.

3.2.3 Etiología

La enfermedad es causada, a nivel molecular, por la expansión de un triplete CAG (que codifica para Glutamina) en el gen de la huntingtina, localizado en el cromosoma 4 (The Huntington's Disease Collaborative Group, 1993). La forma normal del gen es polimórfica, pudiendo contener entre 6 y 36 repeticiones del triplete. La patología aparece cuando el triplete se expande por encima de (CAG)₃₇₋₄₀. El desarrollo de la enfermedad tiene que ver con la magnitud de la expansión: las formas adultas de EH suelen presentar (CAG)₄₀₋₅₅, mientras que con (CAG)₇₀₋₁₈₀ la enfermedad aparece ya en la infancia (Andrew et al., 1993). Estos tripletes se traducen a una cadena de residuos de glutamina (poliQ) en la proteína, mucho más larga en el caso del gen expandido. La huntingtina se expresa en todo el organismo, con niveles similares en el caso de las formas normales y las mutadas (Trottier et al., 1995). Aunque no está clara su función exacta, su *knockeo* en ratones es letal en fases embrionarias (Nasir et al., 1995). En el cerebro, ha sido descrita fundamentalmente en el citosol de las neuronas, asociada a vesículas y microtúbulos, lo que sugiere una función relacionada con el anclaje del citoesqueleto o al transporte de vesículas (DiFiglia et al., 1995; Sharp and Ross, 1996).

La forma mutada tiene actividad tóxica. La expansión de la poliQ conlleva un cambio conformacional de la proteína, que no se procesa correctamente y se acumula en agregados (Ross, 2002). No obstante, no está claro cómo esta alteración conduce al proceso neurodegenerativo. El efecto de la huntingtina mutada (Httm) es probablemente multifactorial y hay varias propues-

tas en cuanto a sistemas afectados en la célula.

- La nueva conformación podría conllevar una ganancia o una pérdida de funcionalidad de la huntingtina (Cattaneo et al., 2001).
- La proteína mutada o los productos de su procesado establecen interacciones aberrantes con otras moléculas. Este fenómeno podría suponer el secuestro de factores de transcripción (Chiang et al., 2005) o la aparición de una actividad microARN (Banez-Coronel et al., 2012), que afectarían a la correcta expresión genética y explicaría ciertos cambios en los perfiles de expresión proteica asociados a la evolución de la enfermedad (Glass et al., 2000).
- El metabolismo energético es otra de las funciones básicas afectadas en la EH (Lodi et al., 2000). La Httm se une a la membrana mitocondrial promoviendo alteraciones en el transporte de calcio y favoreciendo la liberación de citocromo c. El citocromo c constituye en sí un iniciador de la apoptosis, fenómeno responsable al menos en parte de la muerte celular en la EH (Choo et al., 2004; Panov et al., 2002).
- La función del proteasoma tampoco es normal en las células de pacientes con EH (Bennett et al., 2007). Mientras que la huntingtina es normalmente degradada por el sistema ubiquitín-proteasoma, la Httm es procesada en realidad mediante autofagia. No obstante, tampoco este sistema funciona correctamente en la EH, lo que lleva a la acumulación de las formas mutadas en la célula induciendo su muerte (Martinez-Vicente et al., 2010).

3.2.4 El receptor de adenosina A_{2A} en la enfermedad de Huntington

Con la intención de buscar el mecanismo molecular en que se basa la acción de la huntingtina mutada, se han realizado diversas descripciones de los patrones de expresión de ARNm y proteína de las neuronas que sobreviven al proceso neurodegenerativo (Chen et al., 2012; Gines et al., 2006; Glass et al., 2000; Horne et al., 2013; Penney and Young, 1982). Entre las alteraciones moleculares previas a la muerte celular se ha descrito una bajada en la expresión de diversos receptores de membrana no atribuible en exclusiva a la pérdida neuronal y la astrogliosis (Glass et al., 2000; Hodges et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Vonsattel, 2008). Uno de estos receptores es el A_{2A} (figura 15A, página 52). Hay varios trabajos sobre la relevancia que el A_{2A} puede tener en la etiología de la neurodegeneración típica de la enfermedad. Los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) están reducidos en el cerebro postmortem de pacientes de EH (Zuccato and Cattaneo, 2009). Existen evidencias de que la actividad del A_{2A}R participa en la correcta funcionalidad de BDNF (Assaife-Lopes et al., 2013; Tebano et al., 2008). La actividad

del A_{2A}R promueve la actividad del sistema ubiquitín-proteasoma (Chiang et al., 2009), y los polimorfismos de *ADORA2A* han sido relacionados con la edad a la que se desarrolla la enfermedad (Dhaenens et al., 2009). Existen dos propuestas farmacológicas para la EH con el A_{2A}R como diana (figura 15B, página 52):

a) Uso de antagonistas del A_{2A}R en etapas tempranas de la EH

El bloqueo del A_{2A}R en modelos de la EH es una estrategia terapéutica que se apoya en la evidencia de cierta sobreexpresión o incremento de la actividad del receptor en las fases más tempranas del trastorno, previas a cualquier tipo de muerte celular (Chou et al., 2005; Tarditi et al., 2006; Varani et al., 2001). Esta sobreexpresión podría ser un mecanismo compensatorio que estimula vías tróficas o protectoras para las células o simplemente contribuir al proceso neurodegenerativo (Blum et al., 2003b). Para complicar las cosas, el bloqueo del A_{2A}R ha mostrado resultados variables que van desde una prevención de la degeneración (Blum et al., 2003a; Fink et al., 2004) hasta el drástico incremento del daño estriatal (Domenici et al., 2007; Mievis et al., 2011; Popoli et al., 2008). El análisis de esos resultados ha permitido la distinción entre los efectos de la manipulación de los receptores según su localización celular. El bloqueo presináptico del A_{2A}R sería protector, mientras que el postsináptico sería dañino. El efecto neuroprotector estaría relacionado con la prevención de la liberación de glutamato ya comentada en secciones anteriores.

b) Uso de agonistas del A_{2A}R en etapas avanzadas preferiblemente a nivel postsináptico en el estriado (Popoli et al., 2008).

El efecto beneficioso de estas drogas y su capacidad para provocar una mejora de los síntomas han sido mostrados en modelos de ratón (Chou et al., 2005; Huang et al., 2011). Este efecto beneficioso podría explicarse de distintas maneras. La activación del A_{2A}R podría estar relacionada con la recuperación de la funcionalidad del proteasoma (Chiang et al., 2009). Considerando el antagonismo entre el A_{2A}R y el receptor de dopamina D₂, este tipo de tratamiento podría prevenir el potencial tóxico de una excesiva actividad dopaminérgica (Charvin et al., 2005), como de hecho hace con la glutamatérgica (Dunwiddie and Masino, 2001). La activación del A_{2A}R pone en marcha vías de supervivencia celular como la del BDNF (Assaife-Lopes et al., 2013; Tebano et al., 2008), y la estimulación de la vía PKA podría compensar el secuestro de CREB debido a la huntingtina mutada (Chiang et al., 2005). No obstante, como en el caso del uso de antagonistas, los resultados no son inequívocos.

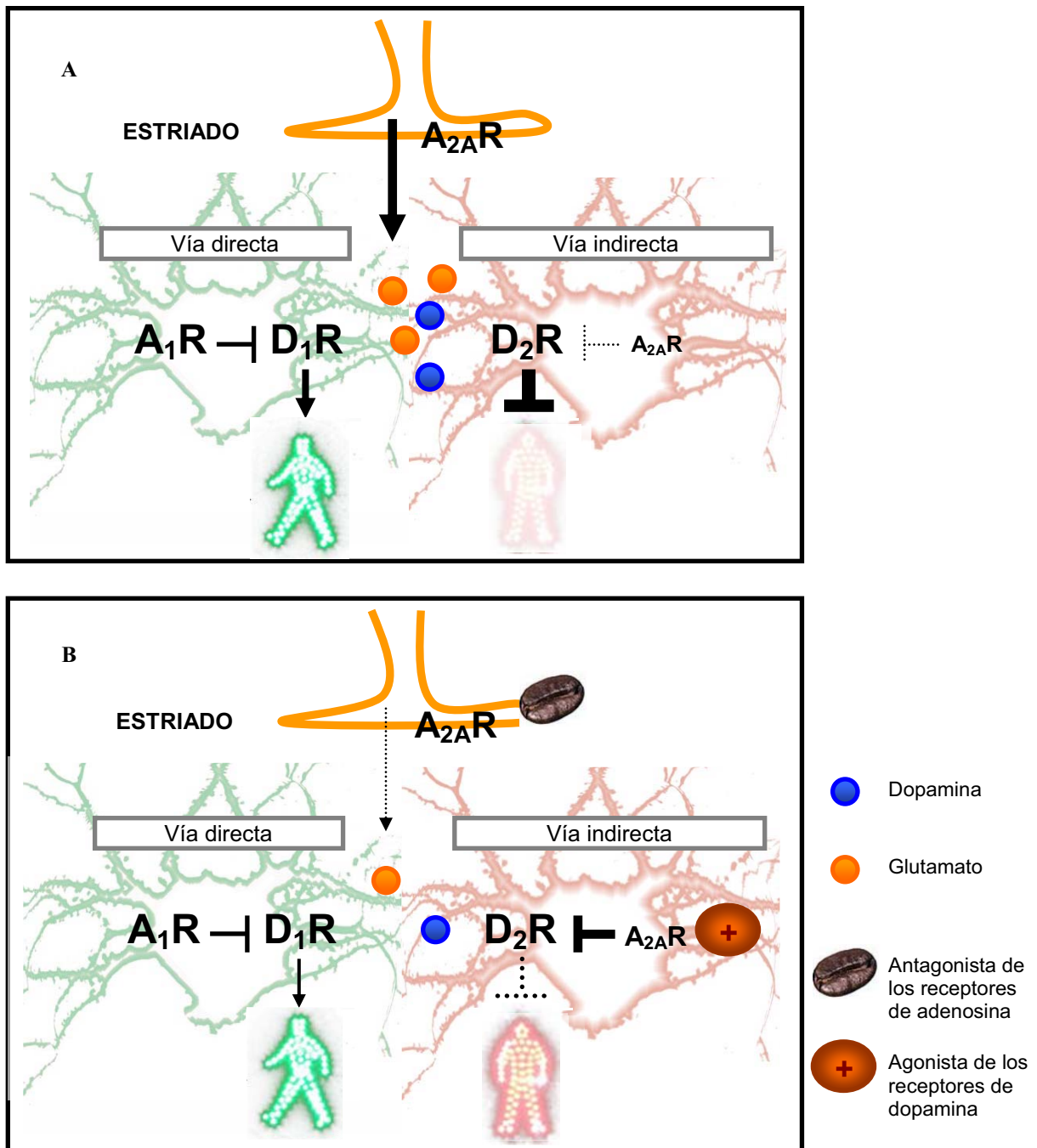


Figura 15. Relevancia del $A_{2A}R$ en la EH. A: influencia del $A_{2A}R$ estriatal en la enfermedad de Huntington. La actividad presináptica del receptor estimula la liberación de glutamato, cuya toxicidad contribuye a la degeneración del estriado. La vía indirecta pierde funcionalidad debido a la reducida expresión del $A_{2A}R$ en sus neuronas. Se pierde así la inhibición motora. B: estrategias terapéuticas relacionadas con el $A_{2A}R$ en la EH. El bloqueo presináptico del receptor reduciría la liberación de glutamato, y con ello su toxicidad. El uso de agonistas postsinápticos recuperaría la funcionalidad del receptor en la vía indirecta, rescatando la inhibición motora.

3.3 La esquizofrenia

La esquizofrenia es un desorden psicótico cuya etiología y categorización no están aún bien definidas. Pese a todo el esfuerzo invertido en la investigación de este trastorno, ni siquiera está claro que el término corresponda a una condición única o si se solapa o no con otros desórdenes similares. La heterogeneidad de los resultados de distintas investigaciones y la práctica clínica, que tiende a la definición de subgrupos fenotípicos de pacientes, apuntan a la idea de que la esquizofrenia se trata de un síndrome, un conjunto de síntomas que producen un cuadro similar pero que responden a causas diversas (Lang et al., 2007; Takahashi, 2013; Tsuang and Faraone, 1995; van Os, 2009).

3.3.1 Las alteraciones motoras en la esquizofrenia

La presencia en niños pequeños de movimientos coreicos o atetosis (movimientos involuntarios, lentos y sinuosos que afectan especialmente a las manos y los dedos) ha sido relacionada con riesgo de padecer esquizofrenia. Estos síntomas se dan también en una parte de los pacientes, antes incluso de iniciar cualquier tratamiento (Peralta et al., 2010). El desarrollo de atetosis en las personas con esquizofrenia ha sido propuesta como una reaparición del trastorno infantil que caracterizaría al menos un subgrupo de ellos (Walker, 1994).

TRASTORNOS MOTORES INDUCIDOS POR FÁRMACOS ANTIDOPAMINÉRGICOS	
TRASTORNOS MOTORES	SÍNDROMES TARDÍOS (persisten al menos un mes tras la retirada del fármaco causante)
Parkinsonismo inducido por neurolepticos: rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural y todo el resto de síntomas de la EP relacionados con la dosis del fármaco.	Discinesia tardía clásica: movimientos repetitivos de masticación y protrusión de la lengua.
Acatisia aguda / tardía: inquietud aliviada por frecuentes movimientos como caminar en el sitio, cambiar el peso de pie, cruzar y descruzar las piernas (si está sentado)	
Reacción distónica aguda: contracciones anormalmente sostenidas de los músculos o de posturas forzadas, que suelen afectar a los ojos, el cuello, la cara o el tronco.	Distonía tardía: contracción sostenida del cuello, el tronco, la zona oral o la cara.

Tabla 4. Trastornos motores inducidos por fármacos antidopaminérgicos. Adaptado de Fahn et al., (2009).

En las personas que reciben tratamiento contra la esquizofrenia es muy frecuente además el desarrollo de alteraciones motoras relacionadas con la actividad de los fármacos antipsicóticos, que bloquean la actividad del receptor de dopamina D₂ (ver tabla 4, página 53). Otro tipo de alteración motora muy común en la esquizofrenia es la de tipo psicogénico. Se distingue de los trastornos motores en que en este caso el movimiento tiene un componente intencional (Fahn et al., 2009). Los manierismos y posturas, por ejemplo, estarían incluidos en esta categoría.

3.3.2 Clínica

El diagnóstico se apoya fundamentalmente en la sintomatología. Las personas afectadas presentan, al menos, dos de los tres grupos de síntomas considerados característicos de la esquizofrenia: síntomas positivos (delirios, alucinaciones, excitación, grandiosidad, recelo...), síntomas negativos (apatía, abulia, depresión, falta de interacción social...) y síntomas generales (que afectan a capacidades cognitivas e incluyen trastornos motores) (tabla 5, página 55). Estos síntomas no son independientes entre sí, sino que pueden solaparse. Esto sucede especialmente entre los síntomas negativos y generales, que parecen tener evolución y respuesta a los tratamientos independientes de las de los síntomas positivos (Boison et al., 2012; Lang et al., 2007; Simpson et al., 2010). No existen tests objetivos para la evaluación de estos síntomas, sino que cada uno de ellos se valora en una entrevista personal con el paciente, mediante el uso de escalas de evaluación como la PANSS (*Positive and Negative Syndrome Scale*) y la NES (*Neurological Evaluation Scale*). Esto es así porque se desconoce la patofisiología de la enfermedad y se carece por tanto de biomarcadores. Aunque existen algunas características biológicas comunes, como el incremento de tamaño de los ventrículos cerebrales o el incremento de los niveles de dopamina, no son lo suficientemente sensibles o específicos como para ser útiles en el diagnóstico (Allen et al., 2009). Mientras no se esclarezca la etiología de la enfermedad, el diagnóstico seguirá basado en la evaluación de los síntomas eliminando los diferenciales más probables (abuso de drogas, contribución de otras condiciones neuropatológicas o enfermedades metabólicas) (van Os, 2009).

3.3.3 Etiología

Las hipótesis acerca de las causas de la esquizofrenia son varias, y no son excluyentes entre sí. Más bien se considera que la combinación de distintos factores genera un perfil de vulnerabilidad. La elevada heredabilidad de la enfermedad apunta a un componente genético, pero sin

Síntomas positivos	Síntomas negativos	Síntomas generales
Delirios	Embotamiento afectivo	Preocupaciones somáticas
Desorganización conceptual	Retracción emocional	Ansiedad
Conducta alucinatoria	Pobre relación	Sentimiento de culpa
Excitación	Retracción social, apatía	Tensión motora
Grandiosidad	Dificultad de pensamiento abstracto	Manierismos y posturas
Susplicacia	Falta de espontaneidad y fluidez en la conversación	Depresión
Hostilidad	Pensamiento estereotipado	Retardo motor
		Falta de colaboración
		Contenidos inusuales del pensamiento
		Desorientación
		Déficit de atención
		Ausencia de juicio e introspección
		Trastornos de la volición
		Control deficiente de impulsos
		Preocupación
		Evitación social activa

Tabla 5. Síntomas positivos, negativos y generales clasificados según los diferentes ítems de la escala PANSS (Kay et al., 1987).

duda no es el único, como demuestra la existencia de gemelos monozigóticos que no comparten la enfermedad (Poltorak et al., 1997), o la asociación entre factores sociales e incidencia de la esquizofrenia (Selten and Cantor-Graae, 2005). Estos hechos hacen razonable pensar en la implicación de mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la enfermedad, puesto que al fin y al cabo son los que integran genotipo y fenotipo. La esquizofrenia ha sido relacionada también con problemas en el desarrollo o en el parto, como infecciones durante el embarazo, que podrían estar relacionados con las alteraciones morfológicas que a menudo se detectan en los cerebros de individuos afectados (ventrículos más amplios de lo normal, reducción del tamaño cerebral, cambios en el grosor de la corteza...) (Lang et al., 2007).

Hay varias hipótesis centradas en el aspecto neuroquímico de la enfermedad, que cogieron fuerza a partir del descubrimiento en los años 60 de la actividad antipsicótica de los antagonistas de los receptores de dopamina. La teoría hiperdopaminérgica propone una hiperactividad

del sistema dopaminérgico en los ganglios basales, relacionada con los síntomas positivos y una hipodopaminergia en el córtex, relacionada con síntomas negativos. Esta teoría se ve apoyada además por la inducción de síntomas psicóticos por el uso de anfetaminas, que estimulan la liberación de dopamina (Laruelle et al., 1999), y por la relación directa entre la efectividad del antipsicótico y su afinidad por los receptores de dopamina (Seeman, 2006). Además, las técnicas de neuroimagen han revelado el aumento en la densidad de receptores de dopamina en el cerebro de personas con esquizofrenia (Howes et al., 2009). Con el tiempo y la mejora de las técnicas de análisis, la teoría de la hiperdopaminergia es matizada poco a poco (Howes and Kapur, 2009). La disfunción del sistema dopaminérgico ha sido enfocada también como subsidiaria a una disfunción del sistema glutamatérgico. La hipótesis de la hipoglutamatergia propone una hipofunción del glutamato en las proyecciones corticoestriatales que sería responsable de los síntomas psicóticos y del aumento de dopamina (Farber, 2003). Los antagonistas de los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDAR) inducen la secreción de dopamina, y provocan síntomas psicóticos en humanos (Farber, 2003; Kafka and Corbett, 1996; Popoli et al., 1994). La activación de los NMDARs atenúa los síntomas negativos y generales en enfermos con esquizofrenia crónica (Black et al., 2009).

Los primeros antipsicóticos descubiertos, gracias a los cuales se elaboró la teoría de la hiperdopaminergia, son conocidos como tratamientos de primera generación. El haloperidol o la clorpromacina son bloqueantes de la señal dopaminérgica con elevada afinidad por los receptores de dopamina D₂. Estos tratamientos mejoran los síntomas positivos de la enfermedad, pero son ineficaces contra los síntomas negativos y generales (Boison et al., 2012; Lang et al., 2007; Simpson et al., 2010). Además, su uso prolongado conlleva la aparición de síntomas secundarios graves de índole extrapiramidal (ver tabla 4, página 53), por lo que los esfuerzos por encontrar una mejor terapia condujeron a la segunda generación de antipsicóticos. Esta segunda generación de sustancias (clozapina, quetiapinas, olanzapina...), denominadas antipsicóticos atípicos, tienen una menor afinidad por el D₂R, como se ha comprobado mediante tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT). Algunas de ellas actúan sobre los receptores de serotonina (Ossowska, 2002). El estudio de la inducción génica promovida por estas sustancias indica que el efecto de los tratamientos de segunda generación afecta sobre todo al sistema límbico, mientras que los de primera actúan también sobre el estriado (Robertson and Fibiger, 1992; Robertson et al., 1994). No obstante, es pronto para asegurar que estas nuevas drogas no inducen trastornos motores, pues el desarrollo de estos efectos secundarios requiere años. Por otro lado, produce otros efectos indeseados, como obesidad o colesterolemia (van Os, 2009).

3.3.4 El receptor de adenosina A_{2A} en la esquizofrenia

Considerando que el bloqueo de la hiperdopaminergia mitiga los síntomas positivos (psicóticos) y la reactivación de la transmisión glutamatérgica mitiga los síntomas negativos y generales, la adenosina emerge como un interesante neuromodulador capaz de interactuar con ambos circuitos. Un estado de **hipoadenosinergia** ha sido propuesto como posible precursor de las disfunciones de los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico en la esquizofrenia (Boison et al., 2012; Lara, 2002). Un déficit de adenosina puede promover la actividad dopaminérgica al perderse el papel inhibitorio que los A₁Rs tienen sobre la liberación de dopamina (Dunwiddie and Masino, 2001; Golembiowska and Zylewska, 1998; Okada et al., 1996; Solinas et al., 2002) y la capacidad de los A_{2A}Rs de inhibir los D₂Rs (Ferre et al., 2008). Por otro lado, como ya se comentó, la estimulación del A_{2A}R induce la liberación del glutamato (figura 16, página 58) (Ciruela et al., 2006; Li et al., 2001; Popoli et al., 1995). Además, este receptor forma heterómeros con los NMDARs, interacción que parece potenciar la actividad de ambos (Ferre et al., 2011). De hecho, el uso de agonistas de los receptores de adenosina contrarresta la inducción de síntomas psicóticos producida por los agonistas de los receptores de dopamina o por los antagonistas de los NMDAR, mientras que el uso de antagonistas de los receptores de adenosina exacerba estos síntomas (Kafka and Corbett, 1996; Popoli et al., 1996; Popoli et al., 1994).

Para reforzar la relevancia que la adenosina o el A_{2A}R pueden tener en la esquizofrenia pueden mencionarse aún múltiples evidencias experimentales (Boison et al., 2012). Como decíamos, la reducción de los niveles de adenosina podría inducir hiperdopaminergia (Lara et al., 2006; Lara and Souza, 2000). La idea de que los niveles de adenosina (cuya medida no es de fácil abordaje) están reducidos en esta enfermedad se ve apoyada por análisis de la expresión de enzimas implicados en su metabolismo, que indican una hiperactividad de las vías que consumen adenosina. Por ejemplo, la variedad de adenosín deaminasa de baja actividad ADA1*2 tiene escasa presencia entre los individuos con esquizofrenia (Dutra et al., 2010). Además, la actividad de dos ectonucleotidasas implicadas en la cascada de producción de adenosina extracelular (la ATPasa y la ADPasa) está reducida en el estriado de cerebros postmortem de personas con esquizofrenia con respecto a casos control (Aliagas et al., 2013). Por otro lado, la sobreexpresión de la adenosín quinasa (AdK) en el cerebro ha sido empleada para generar un modelo de esquizofrenia en ratón, que presenta síntomas similares a los psicóticos y generales de la enfermedad. El aumento de los niveles de adenosina en el estriado de esos ratones reduce estos síntomas (Shen et al., 2012). La manipulación de las vías que afectan a los niveles de adenosina mediante la administración de alopurinol o dipiridamol ha sido evaluada en ensayos clínicos como tera-

pia complementaria a los antipsicóticos, produciendo en algunos casos moderadas mejorías en los síntomas positivos y generales (Akhondzadeh et al., 2005; Akhondzadeh et al., 2000; Brunstein et al., 2005; Lara et al., 2001; Salimi et al., 2008).

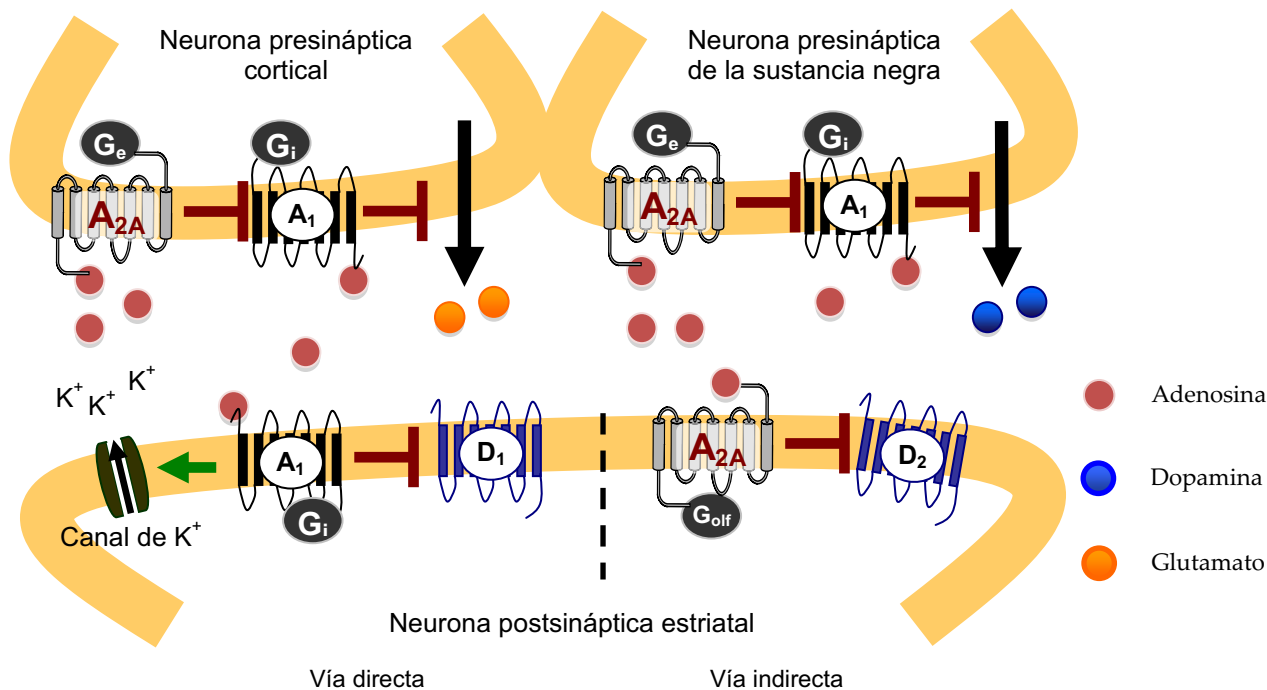


Figura 16. Interacciones del sistema adenosinérgico con el dopaminérgico y glutamatérgico en los ganglios basales. La falta de señal adenosinérgica puede conducir a hiperdopaminergia (al perderse el efecto inhibitorio de los receptores de adenosina sobre los de dopamina) e hipoglutamatérgico (con bajos niveles de adenosina, el A₁R inhibe la liberación de glutamato).

En cuanto al papel concreto que juegan los receptores de adenosina, ya se ha comentado que tanto los agonistas de A_{2A} como los de A₁ contrarrestan los síntomas psicóticos inducidos por agonistas de los receptores de dopamina o antagonistas de los NMDAR (Arguello and Gogos, 2006), mientras que los antagonistas los exacerban (Kafka and Corbett, 1996; Popoli et al., 1996; Popoli et al., 1994). Está descrita una elevada expresión del A_{2A}R en cerebros postmortem de enfermos de esquizofrenia (Kurumaji and Toru, 1998). Posteriormente este aumento ha sido relacionado con el uso de antipsicóticos (Zhang et al., 2012). El brazo corto del cromosoma 22, en concreto la zona 22q11.2, ha sido identificado como una región de riesgo de padecer esquizofrenia (Arguello and Gogos, 2006; Karayiorgou et al., 1995; Murphy, 2005; Rees et al., 2014; Takahashi et al., 2003). El gen *ADORA2A* se encuentra dentro de esta región, en la posición 22q11.23. Además, el gen de Golf, la proteína G a través de la que el A_{2A}R ejerce su señalización en el estriado, ha sido relacionado también con el riesgo de sufrir psicosis (Schwab et al., 1998).

El estriado ha sido implicado en la etiología de la enfermedad, llegando a sugerirse que tiene un papel central tanto en los síntomas positivos (ya que es en los ganglios basales donde la hiperdopaminergia tiene lugar) como en los generales (Simpson et al., 2010). Esta región es la que presenta una mayor expresión del A_{2A}R en todo el cerebro (ver capítulo 2).

4. Regulación epigenética

Conrad Waddington fue el primero en hablar de epigenética a mediados del siglo XX para referirse a los mecanismos que permiten generar diferentes fenotipos a partir de una misma información genética, como ocurre en las diferentes células de un mismo organismo o en organismos clonales como podrían ser los gemelos monozigóticos. Este concepto alude a un gran volumen de información que no está contenido en la secuencia de ADN y que define los patrones de expresión génica. Esta información es potencialmente heredable y, lo que es de gran relevancia, es dinámica. Los cambios en la información genética se producen a largo plazo, mediante la combinación de la mutación y la deriva génica. La variación epigenética, sin embargo, es a medio plazo. Ocurre a lo largo de la vida del individuo, y es fundamental para su adaptación al ambiente. Podría decirse que es la vía mediante la que los genes se comunican con el entorno.

La regulación epigenética ocurre mediante diversos mecanismos moleculares que afectan a la accesibilidad de la hebra de ADN para la maquinaria transcripcional y a la efectividad de la traducción. Se trata de mecanismos imprescindibles en procesos fisiológicos como la diferenciación celular. Su desregulación conduce a situaciones patológicas, como en el caso más paradigmático de los tumores (Portela and Esteller, 2010).

4.1 *Modificación química del ADN*

Se denomina "sitio CpG" al dinucleótido formado por una citosina seguida de una guanina. Cuando son muy frecuentes en una determinada secuencia, se habla de "isla CpG". Estas islas tienen entre 100 y 500 pares de bases de longitud. La citosina de un sitio CpG puede ser modificada químicamente, mediante metilación o hidroximetilación. Recientemente se ha descrito que las citosinas en sitios CHG o CHH (pudiendo ser "H" adenina, timina o guanina) también pueden ser metiladas (Ziller et al., 2011).

4.1.1 Metilación

La adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina es llevada a cabo por las ADN-metiltransferasas (DNMTs). Las más conocidas, DNMT1, DNMT3a y DNMT3b han sido implicadas en el correcto desarrollo y funcionamiento del cerebro (Feng et al., 2005; Feng et al., 2010; Martins-Taylor et al., 2012), y su mutación provoca hipometilación y muerte en estadios embrionarios (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). La metilación está estrechamente relacionada con la actividad transcripcional (Zilberman et al., 2007). Cuando una región del ADN está metilada, se unen a ella proteínas con una especial afinidad por esta marca química, las proteínas de unión a grupos metilo (MBDs). Este fenómeno ha sido comprobado mediante ensayos funcionales en el caso del *ADORA2A* (Buirá et al., 2010a). Hay cinco miembros en esta familia, MeCP₂ y MBD₁₋₄. Estas proteínas reclutan a su vez enzimas que colaboran con la represión epigenética de la zona, como deacetilasas y metilasas de histona (figura 17, página 63) (Ballestar and Wolffe, 2001; Lopez-Serra and Esteller, 2008). La formación de estos complejos impide la correcta unión de las polimerasas y los factores de transcripción a las regiones promotoras (Sunahori et al., 2009; Yossifoff et al., 2008), bloqueando la transcripción del gen. Por el contrario, la metilación de regiones intragénicas es común en genes de expresión ubicua y está relacionada con transcripción activa, asegurando el correcto seguimiento del patrón de lectura e impidiendo la inserción de trasposones (Hellman and Chess, 2007).

4.1.2 Hidroximetilación

La oxidación del grupo metilo de la citosina produce hidroximetilcitosina. Esta modificación del ADN ha sido detectada en todo el organismo, especialmente en el cerebro (Globisch et al., 2010; Kriaucionis and Heintz, 2009) y relacionada con el desarrollo, planteándose la posibilidad de que pudiera estar implicada en algunas patologías neurodegenerativas (Song et al., 2011). Consecuentemente, las proteínas responsables de esta modificación, las proteínas de traslocación *ten-eleven* (TET₁₋₃), se localizan también en el cerebro, especialmente la TET1 (Guo et al., 2011; Tahiliani et al., 2009; Zhang et al., 2013). La hidroximetilación ha sido propuesta como un mecanismo de reactivación de la expresión génica (Wu and Zhang, 2011), dado que promueve desmetilación (Guo et al., 2011) y que las MBDs no se unen a la citosina hidroximetilada (figura 17, página 63) (Jin et al., 2010; Valinluck et al., 2004).

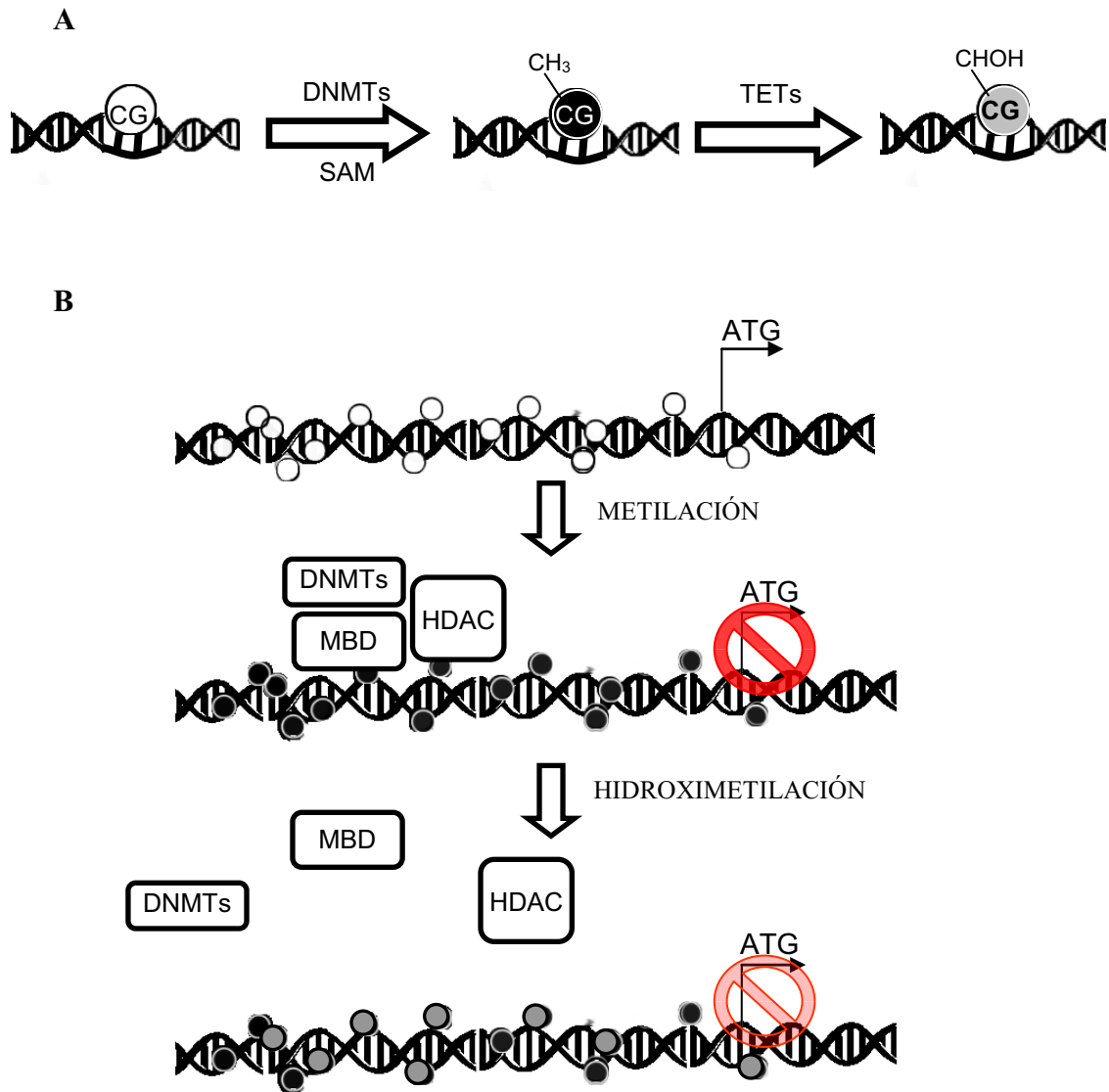


Figura 17. Modificación química del ADN y consecuencias funcionales. A: la citosina de un dinucleótido CG (o sitio CpG) puede ser modificada químicamente. Las ADN-metil transferasas (DNMTs) le añaden un grupo metilo, cedido por la S-adenosil metionina (SAM), generando metilcitosina. Las *ten-eleven translocation proteins* (TETs) oxidan la metilcitosina a hidroximetilcitosina. B: una isla CpG es una secuencia de 100-500pb rica en sitios CpG. La metilación de estas islas CpGs “recluta” proteínas con afinidad por esta marca química (proteínas de unión a metilo o MBDs) que a su vez atraen más DNMTs así como enzimas relacionados con el “cierre” de la hebra de ADN en torno a las histonas, como las deacetilasas de histona (HDAC). Como consecuencia, el gen deja de ser accesible para la maquinaria transcripcional y deja de ser expresado. Estos enzimas no tienen afinidad por la hidroximetilcitosina, por lo que la hidroximetilación ha sido propuesta como potencial mecanismo de reactivación transcripcional.

4.2 Modificación química de histonas

Para formar los cromosomas, el ADN se empaqueta de forma ordenada. Uno de los elementos fundamentales de este empaquetamiento es el nucleosoma: un conjunto de ocho proteínas (dos histonas de cada uno de los tipos H2A, H2B, H3 y H4) en torno a las cuales hay dos vueltas de ADN. La modificación química del extremo N-terminal de las proteínas en torno a las que se enrolla el ADN afecta al grado de compactación del nucleosoma. Distintos aminoácidos pueden ser modificados de diferente manera: acetilación de lisinas, ubiquitinación, fosforilación de serinas o metilación de lisinas o argininas. El efecto de estos cambios es modificar la carga eléctrica del extremo N-terminal de la histona. La vuelta de la hebra de ADN en torno a las histonas será más o menos estrecha en función de esta carga. La acetilación, que neutraliza las cargas positivas, o la fosforilación, que añade cargas negativas, hacen que la hebra de ADN se separe del nucleosoma, y han sido relacionadas con actividad transcripcional (figura 18) (Strahl and Allis, 2000). La metilación ha sido relacionada tanto con activación como con represión transcripcional, según el residuo sobre el que ocurra (Litt et al., 2001; Noma et al., 2001). Las modificaciones de histonas han sido relacionadas con la EH, la EP y la esquizofrenia (Gavin and Sharma, 2010; Sadri-Vakili and Cha, 2006; Urdinguio et al., 2009). No obstante, su estudio en material post-mortem adolece de problemas técnicos importantes (Barrachina et al., 2012), por lo que no ha sido objeto de estudio central en este trabajo.

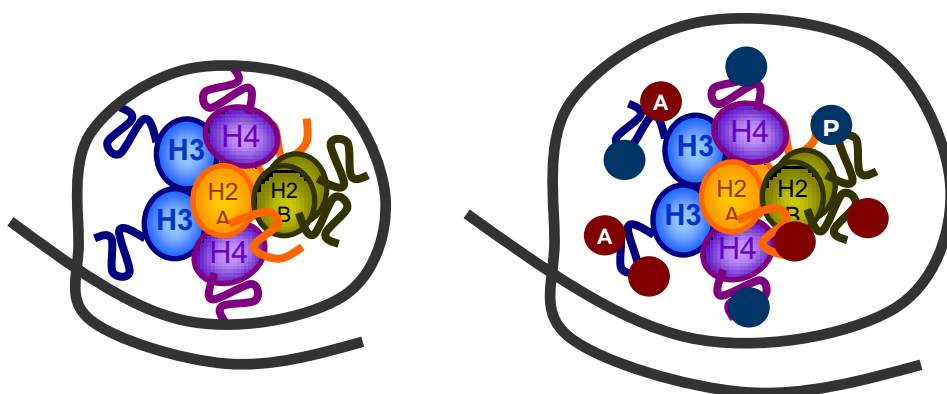


Figura 18. Efecto de la modificación de histonas. A la izquierda, representación esquemática del nucleosoma, con las diferentes histonas y el ADN (línea negra) alrededor. A la derecha, efecto de la fosforilación (bolitas azules) y acetilación (bolitas rojas) de las colas de las histonas, que “abren” la hebra de ADN haciéndola más accesible para la maquinaria transcripcional.

4.3 Micro ARNs

Los microARNs (miARNs) son ARNs monocatenarios no codificantes que juegan un papel fundamental en la represión post-transcripcional. Los miARNs tienen en torno a 20-28 pb, y se unen a la región 3'UTR de los ARNm por homología. Si la complementariedad es perfecta, el ARNm es digerido. Si no, su traducción es bloqueada (Kuss and Chen, 2008). Cada tipo celular tiene un perfil de expresión de miARNs propio, lo que refuerza su implicación en la regulación epigenética (Jovicic et al., 2013).

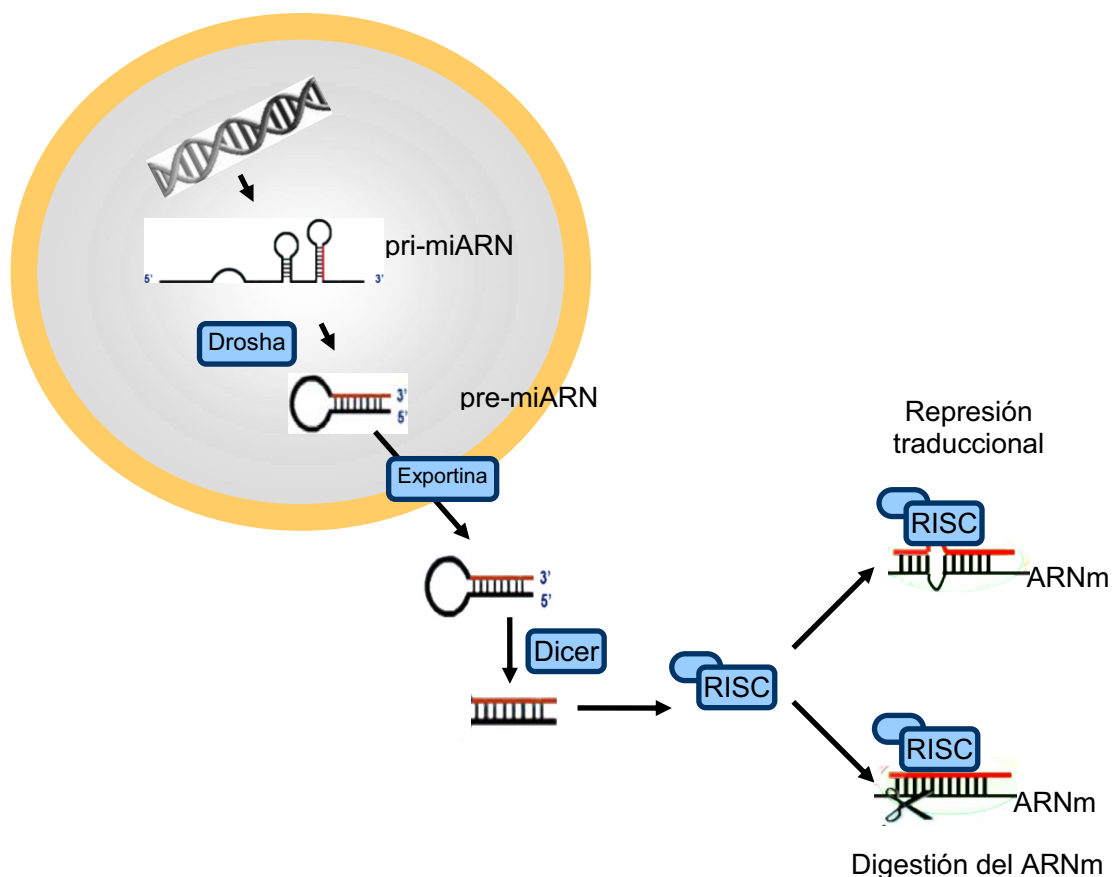


Figura 19. Esquema representativo del procesamiento y funcionamiento de los miARNs. Los ARNs son transcritos a partir del ADN en cadenas que contienen varias repeticiones. Este pri-miARN es digerido por el enzima Drosha a pre-miARNs, cada uno de los cuales originará una sola molécula de miARN. El pre-miARN sale del núcleo al citoplasma con la ayuda de una exportina, y allí sufre una última digestión realizada por el enzima Dicer, obteniéndose el miARN maduro. Entonces puede unirse al complejo enzimático RISC y empezar a funcionar, uniéndose a los ARNm que tiene como diana. Si la homología entre el miARN y el ARNm es perfecta, se induce la digestión del ARNm. Si no, se bloquea su traducción.

Como representa la figura 19 de la página 65, el transcrito primario del miARN es procesado en el núcleo por el enzima Droscha para generar el pre-miARN, que sale al citoplasma. Una vez allí, el enzima Dicer completa su digestión generando un dúplex capaz de reclutar el complejo RISC, que dirige la inhibición de los ARNs diana (Meza-Sosa et al., 2012).

4.4 Desregulación epigenética y neurodegeneración

El correcto funcionamiento de estos mecanismos es esencial para el desarrollo, puesto que son los responsables de guiar la expresión génica a lo largo de las distintas fases de ese proceso. La mutación de MeCP2, por ejemplo, es responsable del Síndrome de Rett, trastorno neurológico que aparece ya en etapas tempranas del desarrollo (Na et al., 2013). La mutación de las DNMTs es letal en fase embrionaria (Li et al., 1992). El resultado del *knockeo* en ratón de enzimas como Dicer, que participan en el procesado de los miARNs, implica también estos ARNs no codificantes en el correcto desarrollo del SNC (Petri et al., 2014). El cerebro es especialmente rico en miARNs. Algunos de ellos sólo se expresan en este tejido. De hecho, se ha sugerido que el desarrollo de este órgano estaría coordinado al menos en parte por “oleadas” de distintos miARNs a lo largo de la embriogénesis (Vreugdenhil and Berezikov, 2010).

Los mecanismos epigenéticos han sido propuestos también como responsables de procesos y funciones básicos para el SNC como la plasticidad sináptica y la formación de la memoria (Feng et al., 2010; Guan et al., 2009; Levenson and Sweatt, 2005; Miller et al., 2008). El epigenoma de cada individuo cambia, por supuesto, con la edad, al ser un rasgo dinámico que responde al entorno.

En la misma línea, se destina un esfuerzo creciente al estudio de la posible relación entre alteraciones epigenéticas y enfermedades neurodegenerativas. La observación de patologías causadas por mutaciones de los enzimas responsables de la regulación epigenética, por un lado, y el desarrollo de determinadas enfermedades por solo un individuo en parejas de gemelos homocigóticos, por otro, proporcionan evidencias que refuerzan el potencial de las alteraciones epigenéticas como agentes causales de determinadas patologías. La importancia de la epigenética en el desarrollo y funcionamiento del SNC y su evolución con la edad o en respuesta a cambios ambientales la convierten en un elemento de potencial interés en el estudio y tratamiento de los trastornos neurodegenerativos. Las evidencias que señalan posibles relaciones entre las patologías tratadas en este trabajo y la epigenética serán tratadas en el apartado correspondiente a cada una de ellas.

4.4.1 Alteraciones epigenéticas en la enfermedad de Parkinson

Las diferencias interculturales en la incidencia de la EP y su asociación con factores ambientales como la exposición a pesticidas llevan a plantearse la posible implicación de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, la terapia más habitual empleada en el tratamiento de la EP, la levodopa (L-dopa), induce serios efectos secundarios en los pacientes tratados a largo plazo. El metabolismo de la L-dopa consume SAM, induciendo hiperhomocisteinemia en los pacientes que reciben este tratamiento. La reducción de los niveles de SAM, el principal donador de grupos metilo en el organismo, podría inducir hipometilación del ADN (De Bonis et al., 2010; Liu et al., 2000; Muller et al., 2001; Obeid et al., 2009; Zoccolella et al., 2009).

a) Alteraciones de los patrones de metilación en la EP

La hipometilación de islas CpG en el intrón 1 de la α -sinucleína, y su consecuente sobreexpresión ha sido descrita en múltiples áreas del cerebro en tejido postmortem de casos de EP esporádico (Jowaed et al., 2010). La α -sinucleína es capaz además de secuestrar en el citoplasma la DNMT1. Su presencia en el núcleo es de hecho reducida en cerebros postmortem de individuos afectados por la EP y en modelos transgénicos de la enfermedad, lo que redundaría en una mayor hipometilación (Desplats et al., 2011). Otros genes relevantes para la etiología de la enfermedad han sido relacionados con hipometilación (Kaut et al., 2012).

b) Alteraciones de los miARNs en la EP

El análisis de los niveles del hsa-miARN-133 muestra una reducción en cerebros postmortem de individuos afectados por la EP. Este miARN es específico de neuronas dopaminérgicas, precisamente las que degeneran en esta enfermedad, en las que regula la maduración y funcionalidad celular (Kim et al., 2007). Por otro lado se ha descrito una reducción en los niveles de los miARNs hsa-miR-34b y hsa-miR-34c en diferentes regiones cerebrales a lo largo de diferentes etapas de la enfermedad. Los bajos niveles de estos miARNs han sido relacionados con disfunción mitocondrial (Miñones-Moyano et al., 2011).

4.4.2 Alteraciones epigenéticas en la enfermedad de Huntington

Aunque la EH tiene un origen claramente genético, la importancia de la desregulación transcripcional en la enfermedad justifica el interés depositado en los mecanismos de regulación de

la expresión génica. La huntingtina mutada es capaz de secuestrar factores de transcripción y unirse al ADN, con lo que es potencialmente capaz de modificar los patrones de expresión génica por sí sola (Benn et al., 2008; Chiang et al., 2005). No obstante, los mecanismos epigenéticos han sido relacionados también con los patrones de expresión proteica en la EH. Su correcta definición a lo largo del proceso neurodegenerativo ofrece no sólo una mejor comprensión de la enfermedad sino que podría descubrir dianas terapéuticas paliativas de utilidad en su tratamiento.

a) Alteraciones de los patrones de metilación en la EH

Los trabajos que mejor relacionan la metilación del ADN con la enfermedad de Huntington son escasos, recientes y preliminares. Patrones de metilación aberrantes, así como una importante disminución de la expresión de la DNMT1 han sido descritos en líneas celulares transfectadas con huntingtina mutada (Ng et al., 2013). Estos resultados aún han de comprobarse en tejido humano.

b) Alteraciones de las modificaciones de histonas en la EH

Los modelos de EH suelen mostrar hipoacetilación de histonas que correlaciona con patrones de expresión génica reducida. Los resultados de este tipo de estudio en cerebro humano postmortem difieren ligeramente. Por un lado, la inmunohistoquímica concuerda (Yeh et al., 2013). Sin embargo, el análisis de expresión de ARNm en tejido humano postmortem señala una sobreexpresión de HAT (Anderson et al., 2008). La huntingtina mutada secuestra la proteína de unión a CREB o CBP, que actúa como acetil transferasa de histona (HAT), lo que podría estar facilitando esta hipoacetilación (Giralt et al., 2012). En cualquier caso, los inhibidores de las deacetilasas de histona (HDACi) han llegado a probarse en ensayos clínicos como terapia en casos de EH. En uno de ellos, el tratamiento con ácido valproico redujo problemas de hiperkinesia en los individuos tratados (Narayan and Dragunow, 2010; Saft et al., 2006).

c) Alteraciones de los miARNs en la EH

Las alteraciones de la vía de maduración de los miARNs pueden relacionarse con neurodegeneración y con la toxicidad de las proteínas poliglutaminadas, como la huntingtina (Bilen et al., 2006). La propia huntingtina mutada ha sido sugerida como elemento con actividad miARN (Miñones-Moyano et al., 2011). Los trabajos más desarrollados en torno a una posible alteración de la funcionalidad de los miARNs en la EH tienen que ver con el factor represor de la trans-

cripción REST. La proteína REST está normalmente presente en el citoplasma, unida a la huntingtina. Esta unión se ve afectada por la mutación de la huntingtina. En esas circunstancias, REST migra al núcleo, donde reprime la expresión de determinados genes. Entre ellos, los hay que codifican para proteínas, pero también para miARNs, según ha sido descrito en modelos celulares y murinos, y en cerebros postmortem (Johnson et al., 2008; Soldati et al., 2013; Zuccato et al., 2003). También en modelos de ratón se han descrito alteraciones en los niveles de determinados miARNs cuyas dianas podrían estar relacionados con plasticidad y supervivencia neuronal (Jin et al., 2012).

4.4.3 Alteraciones epigenéticas en la esquizofrenia

Existen razones consistentes para relacionar la esquizofrenia con la epigenética. Las parejas de gemelos monozigóticos en las que sólo uno de ellos desarrolla la enfermedad (Poltorak et al., 1997), o la asociación entre la incidencia de la enfermedad y factores del entorno, como pobreza, vida en la ciudad, estatus migratorio o nivel educativo constituyen evidencias en este sentido (Selten and Cantor-Graae, 2005).

a) Alteraciones de los patrones de metilación en la esquizofrenia

Los genes de la reelina y la descarboxilasa del glutamato (GAD67), relacionados con plasticidad sináptica y neurotransmisión GABAérgica, se expresan a niveles bajos en distintas regiones cerebrales de individuos con esquizofrenia (Akbarian et al., 1995; Guidotti et al., 2000; Impagnatiello et al., 1998). La expresión de estos genes se ve regulada por metilación de su promotor, que lleva a cabo la DNMT1 (Kundakovic et al., 2009; Noh et al., 2005). Este enzima está de hecho sobreexpresado en múltiples regiones cerebrales en tejido postmortem de individuos con esquizofrenia coincidiendo con la bajada de los niveles de reelina y GAD67 (Veldic et al., 2005; Veldic et al., 2007), lo que puede relacionarse con la hipermetilación descrita para el promotor de la reelina (Grayson et al., 2005). Además, los niveles de SAM son más elevados en el córtex en tejido postmortem de individuos afectados por la enfermedad que en controles (Guidotti et al., 2007). El SAM es el sustrato para las reacciones de metilación del ADN catalizadas por las DNMTs e inhibe la desmetilación, por lo que podría estar relacionado con la hipermetilación que estamos describiendo. Considerando estos datos, llama la atención que el SAM haya sido usado como terapia en pacientes con esquizofrenia con resultados positivos. En realidad, el ensayo se realizó en un subgrupo de pacientes con niveles reducidos de la catecol-

metiltransferasa, un enzima que media la degradación de la dopamina, y podría no ser efectivo en otros subgrupos (Strous et al., 2009).

b) Alteraciones de las modificaciones de histonas en la esquizofrenia

La expresión de la reelina puede ser rescatada también mediante el uso de inhibidores de las HDACs como el ácido valproico o la tricostatina A (Chen et al., 2002). El ácido valproico ha sido probado como terapia complementaria de los antipsicóticos, mejorando en algunos casos los síntomas positivos y negativos y ampliando el efecto de la terapia principal a individuos previamente resistentes (Larrison et al., 2011; Wassef et al., 2000).

c) Alteraciones de los miARNs en la esquizofrenia

Se está invirtiendo bastante esfuerzo en la investigación del papel que los miARNs podrían desempeñar en la esquizofrenia, ya que cada uno de ellos puede regular cientos de proteínas y parecen buenos candidatos para explicar una enfermedad con alta heredabilidad pero sin una clara asociación genética. Existen múltiples estudios realizados en tejido postmortem que aportan datos prometedores, aunque no exentos de controversia, debido probablemente al uso de distintas aproximaciones o la selección de distintas regiones cerebrales para el estudio (Beveridge and Cairns, 2012; Kolshus et al., 2013). La desregulación de los patrones de expresión de los miARNs ha sido relacionada con alteraciones en su biogénesis, pero también con estrés maternal durante la gestación (también relacionado con hipermetilación de GAD67 (Matrisciano et al., 2013; Zucchi et al., 2013)) o con el tratamiento farmacológico (Beveridge and Cairns, 2012).

5. El trabajo con material procedente de bancos de tejido humano

La mayor parte del trabajo de esta tesis se ha realizado sobre tejido cerebral humano congelado conservado en los bancos de tejidos neurológicos del Hospital Universitario de Bellvitge, el Parc Sanitari Sant Joan de Déu y el Hospital Clínic. Los resultados obtenidos con este tipo de material tienen una especial relevancia porque ofrecen una visión real de lo que sucede en una enfermedad, al contrario de lo que sucede con los modelos. No obstante, trabajar con material humano postmortem plantea una serie de limitaciones que es muy importante tener en cuenta.

5.1 *Características limitantes del material procedente de los bancos de tejidos*

5.1.1 Estado de conservación

A la hora de estudiar una determinada característica bioquímica en un tejido humano postmortem hay que tener en cuenta que la integridad del elemento a analizar puede estar comprometida por el estado de conservación de la muestra. Es imprescindible realizar estudios que permitan establecer un margen de fiabilidad para las condiciones que afectan a los distintos elementos de la muestra. Esfuerzos en este sentido han sido realizados en este laboratorio (Barrachina et al., 2006; Barrachina and Ferrer, 2009; Barrachina et al., 2012; Ferrer et al., 2008). Existen algunas herramientas que permiten comprobar la calidad de la muestra, como por ejemplo el número RIN, que indica la integridad del ARN y permite seleccionar así las muestras mejor conservadas para este tipo de moléculas.

a) Premortem

Las condiciones que rodean el momento de la muerte pueden afectar a los perfiles moleculares y el estado de preservación de la muestra. La duración del estado agónico promueve el efecto

que el suministro de fármacos o las condiciones de hipoxia pueden tener sobre el tejido.

b) Postmortem

El tiempo que pasa entre el momento de la muerte y la congelación del tejido, y la temperatura a la que ese tiempo ha tenido lugar afectan a la preservación de la muestra.

5.1.2 Escasez

Las muestras de tejido cerebral humano son escasas y muy valiosas. No sólo son escasas, sino que los problemas asociados al estado de conservación de las muestras hacen necesario en ocasiones el descarte de buena parte de ellas. Determinados estudios ni siquiera pueden llevarse a cabo usando este tipo de material. Este hecho dificulta en ocasiones la realización de estudios de gran potencia estadística, como los epidemiológicos.

5.1.3 Heterogeneidad

A diferencia de las muestras procedentes de modelos, obtenidas a menudo de individuos prácticamente clónicos y con unas condiciones de vida estandarizadas, las muestras de origen humano son intrínsecamente heterogéneas. Los hábitos y formas de vida de cada uno de los donantes constituyen toda una fuente de variabilidad, que puede empañar la significatividad de los resultados. Esto reviste especial relevancia por ejemplo a la hora de analizar regulación epigenética, estrechamente relacionada con la interacción entre el individuo y el ambiente.

5.1.4 Comorbilidad

Afortunadamente, muchas de las muestras que podemos obtener en un banco de tejido cerebral humano corresponden a individuos de avanzada edad. El análisis neuropatológico postmortem de estos cerebros revela muy a menudo la presencia de marcas diagnósticas de enfermedades que pudieron no ser diagnosticadas en vida por no desarrollar ninguna sintomatología. Hasta el 80% de las personas que superan los 65 años de edad presentan en el cerebro marcas diagnósticas para la enfermedad de Alzheimer, pese a no haberla desarrollado nunca (Ferrer, 2012).

Es decir, hay una comorbilidad inherente a las muestras de tejido humano que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar los grupos de comparación, añadiendo este factor a otros más habituales como la edad o el sexo.

II. OBJETIVOS

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado mediante ensayos funcionales cómo la metilación juega un papel fundamental en la expresión basal del receptor A_{2A} en distintas líneas celulares. Esos trabajos han puesto de manifiesto además cómo este mecanismo estaba implicado en la regulación tejido específica del receptor, mediante la comparación de los perfiles de metilación en distintas zonas del promotor de *ADORA2A* y de los niveles de expresión proteica entre el putamen y el cerebelo.

Como continuación, este trabajo ha tratado de caracterizar la implicación de la metilación en las alteraciones patológicas de la expresión del receptor de adenosina $A_{2A}R$ que ocurren en las enfermedades de Parkinson y Huntington y en la esquizofrenia. Para ello se ha trabajado fundamentalmente con muestras humanas procedentes de los bancos de tejidos neurológicos del Hospital Universitario de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat), del Parc Sanitari Sant Joan de Déu (Sant Boi de Llobregat) y del Hospital Clinic (Barcelona).

La región cerebral en la que nos hemos centrado ha sido el putamen, dada la relevancia que los niveles de $A_{2A}R$ en este órgano tienen para el control motor.

OBJETIVOS

1. Determinar si la metilación del ADN juega un papel en la sobreexpresión patológica del $A_{2A}R$ en la enfermedad de Parkinson.
2. Determinar si la metilación del ADN juega un papel en la reducción patológica de la expresión del $A_{2A}R$ en la enfermedad de Huntington.
3. Determinar los niveles de expresión de los receptores de adenosina en esquizofrenia como paradigma de trastorno hiperdopaminérgico.

III. PUBLICACIONES

Artículo en revisión: El incremento de los niveles del receptor de adenosine A_{2A} es un evento temprano en la enfermedad de Parkinson.

Resumen El receptor de adenosine A_{2A} (A_{2A}R) es un receptor acoplado a proteína G que estimula la actividad de la adenilato ciclasa. En el cerebro, el A_{2A}R se encuentra altamente enriquecido en las neuronas espinosas medianas GABAérgicas del estriado, que están implicadas en el control del movimiento. La modulación farmacológica de los A_{2A}Rs es especialmente útil en la enfermedad de Parkinson (EP) debido a su capacidad de antagonizar la actividad del receptor de dopamina D₂. Incrementos en los niveles de los A_{2A}Rs han sido descritos en la EP, aunque no está claro si son debidos al tratamiento con L-dopa o a la neurodegeneración de la sustancia negra. En el presente trabajo se muestra que el incremento en los niveles del A_{2A}R se detecta en el putamen de personas en estadios de la EP presintomáticos (estadios de Braak 1-2) con respecto a individuos control de edad similar. Sin embargo, los niveles de ARNm no presentan diferencias, lo que sugiere la implicación de mecanismos de regulación postranscripcional en la regulación de la expresión del A_{2A}R. La reducción de la expresión de los microARNs miR-34b/c ha sido descrita previamente como un evento temprano en pacientes de EP. Los niveles del miR-34b están significativamente reducidos en los putámenes de los estadios presintomáticos y sintomáticos analizados en el presente trabajo. Considerando que la región 3'UTR del ARNm del A_{2A}R contiene una secuencia predicha como diana para el miR-34b, se comprobó el papel que este microARN podría tener en la regulación del A_{2A}R. Los estudios in vitro realizados muestran cómo la expresión endógena del A_{2A}R aumenta al bloquear la actividad del miR-34b mediante el uso de un anti-miR específico. Además, la mutación puntual en el lugar de unión predicho por las bases de datos en la región 3'UTR del *ADORA2A* elimina el efecto represor que una molécula análoga al miR-34b tiene sobre la luciferasa empleada como gen reportero. Por otro lado, se muestra una reducción en el porcentaje de metilación en la zona 5'UTR del *ADORA2A* en los casos de EP sintomáticos. En conjunto, estos resultados que el incremento de los niveles del A_{2A}R ocurre ya en etapas presintomáticas de la EP y proporciona información nueva acerca de los mecanismos responsables de la expresión del A_{2A}R a lo largo de la progresión de esta enfermedad neurodegenerativa.

INCREASED STRIATAL ADENOSINE A_{2A} RECEPTOR LEVELS IS AN EARLY EVENT IN PARKINSON'S DISEASE

Izaskun Villar-Menéndez¹, Sílvia Porta^{1,‡}, Sandra P. Buira¹, José Luis Albasanz^{2,3}, Isidre Ferrer^{1,4,5}, Mairena Martín^{2,3} and Marta Barrachina^{1,5*}

¹Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital-ICS, [Bellvitge Biomedical Research Institute-] IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain;

²Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain;

³Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Medicina de Ciudad Real, CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain;

⁴Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Spain.

[‡]Present address: Department of Laboratory and Pathology Medicine, Center for Neurodegenerative Disease Research, University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

*Corresponding author: Marta Barrachina, PhD, Institute of Neuropathology, [Bellvitge Biomedical Research Institute-] IDIBELL, Bellvitge University Hospital-ICS, Av. Gran Via de L'Hospitalet 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Telephone and FAX number: +34 93 2607215. Email: mbarrachina@idibell.cat

ABSTRACT

Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) is a G-protein coupled receptor that stimulates adenylyl cyclase activity. In the brain, A_{2A}Rs are found highly enriched in striatal GABAergic medium spiny neurons, related to the control of voluntary movement. Pharmacological modulation of A_{2A}Rs is particularly useful in Parkinson's disease (PD) due to their property of antagonizing dopamine D₂ receptor activity. Increases in A_{2A}R levels have been described in PD, although there is controversy regarding whether this is due to L-dopa treatment or to substantia nigra neurodegeneration. In the present report, we show that increased A_{2A}Rs protein levels were detected in the putamen of prodromal PD patients (Braak PD stages 1-2) with respect to age-matched controls.

By contrast, A_{2A} Rs mRNA levels remained unchanged, suggesting that posttranslational mechanisms could be involved in the regulation of A_{2A} Rs. It has been described how miR-34b/c downregulation is an early event PD patients. We found that miR-34b levels are also significantly reduced in the putamen of prodromal PD patients and along disease progression. Given that 3'UTR of A_{2A} R contains a predicted target site for miR-34b, the potential role of this miRNA in protein A_{2A} R levels was assessed. In vitro studies revealed that endogenous A_{2A} R protein levels increased when miR-34b function was blocked using a specific anti-miR-34b. Moreover, using a luciferase reporter assay with point mutations in an miR-34b predicted binding site within the 3'UTR region of A_{2A} R mRNA abolished the effect of the miRNA using a miR-34b mimic. In addition, we showed a reduced percentage of DNA methylation in the 5'UTR region of *ADORA2A* in advanced PD cases. Overall, these findings reveal that increased A_{2A} R protein levels occur in asymptomatic PD patients and provide new insights into the molecular mechanisms underlying A_{2A} R expression levels along the progression of this neurodegenerative disease.

Keywords: Adenosine A_{2A} receptor, *ADORA2A*, miR-34b, putamen, Parkinson's disease, post-mortem.

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a human neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the presence of α -synuclein-containing intraneuronal inclusions called Lewy bodies and aberrant Lewy neurites (Braak et al., 2003). PD is clinically manifested by the presence of motor disturbances such as resting tremor, bradykinesia, rigidity, and postural instability. According to Braak et al. (2003) α -synuclein inclusions are first found in the medulla oblongata (stages 1-2), then the midbrain and amygdala (stages 3-4) and finally the cerebral cortex (stages 5-6). Motor symptomatology appears after the loss of dopaminergic neuronal cells in the substantia nigra pars compacta (more than 60%) at late stages 3 or 4 of Braak. Prodromal (pre-motor or incidental) PD corresponds to those cases with Lewy bodies or neurites in the brain stem without any motor disturbance (Jellinger, 2004; Saito et al., 2004).

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: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , and A_3 (Fredholm et al., 2001). In the central nervous system (CNS), A_1 Rs are associated with neuroprotective processes and they are upregulated in human neu-

rodenerative diseases with abnormal protein aggregates (Albasanz et al., 2007, 2008; Angulo et al., 2003; Perez-Buira et al., 2007; Rodríguez et al., 2006). By contrast, A_{2A}Rs activity is related to the modulation of glutamate release and it is associated with the outcome of cerebral injury as well as the development of A β -induced synaptotoxicity (Canas et al., 2009; Cunha, 2005; Stone et al., 2009). The brain region most enriched in A_{2A}Rs is the striatum, in which A_{2A}Rs are largely restricted to GABAergic spiny medium neurons of the indirect pathway, projecting from the caudate-putamen to the external globus pallidus and also expressing dopamine D₂ receptors (D₂Rs) (Fuxe et al., 2007). It has been reported that A_{2A}R expression levels are upregulated in the putamen and in peripheral blood cells from PD patients with levodopa-induced dyskinesias, and that these levels correlate with the severity of the disease (Calon et al., 2004; Casetta et al., 2013; Varani et al., 2010). Moreover, PET studies have confirmed striatal A_{2A}R upregulation in PD, even in drug-naive patients (Mishina et al., 2011; Ramlackhansingh et al., 2011). However, it needs to be clarified whether A_{2A}R upregulation is a primary event in prodromal PD or rather a consequence of neuronal death in the substantia nigra.

In the last few years the study of the transcriptional mechanisms of A_{2A}R gene (*ADORA2A*) regulation have demonstrated that DNA methylation plays a role in the baseline A_{2A}R expression levels in the brain (Buira et al., 2010a, 2010b). DNA methylation is an epigenetic mechanism associated with gene repression (Jones, 2012). Interestingly, an increase in the DNA methylation percentage in *ADORA2A* gene has been attributed to reduced A_{2A}R protein levels in Huntington's disease (HD) and in a subgroup of schizophrenia patients (Villar-Menéndez et al., 2013, 2014).

Therefore, based on these findings, our study was designed to clarify whether A_{2A}R upregulation was an early event in prodromal PD patients, and to elucidate potential molecular mechanisms playing a role in pathological *ADORA2A* expression. In this sense, not only has the role of DNA methylation been studied, but also the putative role of microRNAs (miRNAs) in the control of A_{2A}R protein levels. miRNAs are small non-coding RNAs, 21-24 nucleotides in length, that act as post-transcriptional regulators, binding to specific binding sites located in the 3'-untranslated region (3'UTR) of mRNAs to inhibit their translation by promoting mRNA degradation or by blocking ribosomal activity (Lagos-Quintana et al., 2001). A previous study described how reduced miR-34b/c levels were an early event in PD (Miñones-Moyano et al., 2011). Given that the 3'UTR region of A_{2A}R mRNA shows predicted binding sites for miR-34b, the present study was designed to probe more deeply into the putative relationship between miR-34b and A_{2A}R protein levels.

MATERIAL AND METHODS

Human brain samples

Tissue samples were provided by the Neurological Tissue Bank - Hospital Clínic de Barcelona and the Institute of Neuropathology, HUB-ICO-IDIBELL Brain Bank. The donation and obtaining of samples from the CNS are regulated by the ethics committees of the two institutions. The sample processing followed the rules of the European Brain Bank Network: BrainNet Europe II (BNEII). All the samples are protected in terms of individual donor identification following the BNEII laws. The brains were maintained half in formalin for morphological and immunohistochemical studies, while the other half was processed in coronal sections to be frozen at -80°C and made available for biochemical studies. The neuropathological exams were performed in all cases on twenty sections of brain, both cerebellum and brainstem. For a first approximation towards a neuropathological diagnosis of the disease, sections were 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. Brains from individuals without neurological history or neuropathological lesions after the standard exam were used as control group samples. The neuropathological diagnoses were made according to well-established criteria for PD (Braak et al., 2003). All cases analyzed are summarized in Table 1.

Quantitative DNA methylation analysis

The percentage of DNA methylation was evaluated in three loci within the 5'UTR of *ADORA2A* gene, previously reported as being relevant for its transcriptional regulation (Buirá et al., 2010b). DNA purification, bisulfite treatment, and quantitative DNA methylation analysis were performed with the MassArray platform of SEQUENOM as described (Buirá et al., 2010b). The primers used for PCR amplification were the following: A_{2A}R-10069 (PCR 1), A_{2A}R-8973 (PCR 2), and A_{2A}R-7883 (PCR 3) (Figure 2A) (Buirá et al., 2010b).

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 the addition of 10 μ M of retinoic acid (RA) in the growth medium for 96 hours (Sigma, Madrid, Spain). Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Anti-miR-34b transient transfection SH-SY5Y cells were plated on 12-well dishes at a concentration of 60,000 cells/well and cultured overnight before transfection. The following day, cells were treated with 10 μ M RA for 96 hours. Cells were transfected with 50 nM anti-miR-34b (Exiqon, Cat. No 410215-00) in Opti-

MEM (Invitrogen) using lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) and following the instructions of the manufacturer. After 5 hours of transfection, the medium was replaced with fresh medium. Cells were maintained for 48 hours in the presence of RA. As a negative control, scrambled anti-miRNA was used (Exiqon, Cat. No 199004-00).

miRNA luciferase reporter assay

A vector pMirTarget containing wild-type A_{2A}R 3'UTR (Origene, Rockville, MD, USA) was used to measure luciferase activity. Point mutations were introduced into a predicted miR-34b binding site located in the A_{2A}R 3'UTR using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The primers used were: Forward, 5'ACCCAGTGAGAGGCCTTGCTATGTCCGTTTCTTCTAAAGGGAATGT-3', and Reverse, 5'-ACATTCCTTTAGAAGAAACGGACATAGACAAGGCCTCTCACTGGGT-3'. The sequence of the mutated vector was verified by sequence analysis (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). One μ g of A_{2A}R 3'UTR pMirTarget or mutated vectors were cotransfected into non-RA-treated SH-SY5Y cells with the 50 nM of mimic miR-34b (Ambion, Cat. No MC10743). After 48 hours, cells were lysed using the reporter lysis buffer (Promega, Madrid, Spain) and luciferase was measured in a Fluostar Optima lector (BMG Labtech, Madrid, Spain). As pMirTarget vectors co-express the red fluorescence protein (RFP), the fluorescence was measured in the same lysates and used to normalize the luciferase activity results.

RNA isolation

Total RNA was extracted from 50 mg of human putamen with the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the protocol provided by the manufacturer. The concentration of each sample was measured with a Nanodrop 1000. RNA integrity was tested using the Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies). Only RNA samples with RIN > 7 were analyzed. miRNA expression analysis was performed with RNA extracted from 10 mg of human putamen using the miRNeasy Mini kit (Qiagen) following the protocol provided by the manufacturer. The RNA concentration and integrity were evaluated as above and only RNA samples with RIN > 5.5 were analyzed.

mRNA 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. One mg of RNA was retrotranscribed in a final volume of 10 μ l. Parallel reactions for each RNA sample were run in the absence of MultiScribe Reverse Transcriptase to rule out the presence of contaminating genomic DNA.

TaqMan PCR

ADORA2A expression levels were evaluated by TaqMan PCR assay. Each reaction was performed in duplicate 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 of each 1/20 retrotranscribed RNA was mixed with 1 μ l of 20x TaqMan Gene Expression Assays and 10 μ l of 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). The expression of β -glucuronidase (GUSB) was analysed in parallel assays for each sample and was used to normalise the results. Standard curves were prepared for *A_{2A}R* and GUSB using serial dilutions of cDNA from a control putamen sample. The identification number for *ADORA2A* and GUSB TaqMan probes were Hs00169123_m1 and Hs99999908_m1, respectively (Applied Biosystems).

miRNA retrotranscription and real time PCR

miRNA retrotranscription reaction was performed using the Universal cDNA Synthesis kit (Exiqon) following the instructions of the supplier. The real time PCR was carried out in triplicate using the miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR (Exiqon) in the LightCycler® 480 System (Roche, Sant Cugat del Vallès, Spain). For each 10 μ l PCR reaction, 4 μ l of retrotranscribed miRNAs was mixed with 5 μ l of Master Mix and 1 μ l of specific primers (Exiqon). The small nucleolar RNA SNORD38B was used as a loading control and to normalize the real-time PCR results. Standard curves were prepared for miR-34b/c and SNORD38B using serial dilutions of a control putamen. RT-PCR reactions were repeated twice and all PCRs were run in duplicate.

Western blot

Plasma membrane extracts from human post-mortem putamen were purified as previously described (Pérez-Buira et al., 2007). Protein from transfected SH-SY5Y cells were extracted using RIPA buffer. Cellular lysates were maintained in agitation for 30 minutes at 4°C and then centrifuged at 15,000 g for 12 minutes at 4°C. Protein concentration from the resulting supernatant was determined with the BCA method (Pierce, Woburn, MA, USA). 15 μ g of protein from human plasma membranes and transfected SH-SY5Y was used for western blot. The following antibodies were used: rabbit polyclonal *A_{2A}R* (ab3461, Abcam, Cambridge, UK) used at a dilution of 1:1,000, mouse monoclonal anti- β -actin (clone AC-74, Sigma) diluted 1:10,000, and rabbit polyclonal anti-GAPDH (Signalway, Madrid, Spain) at a dilution of 1:15,000.

[³H]ZM 241385 binding assay to plasma membranes

Plasma membrane extracts from human post-mortem putamen were used for *A_{2A}R* binding

assays as previously described (Albasanz et al., 2008). Briefly, plasma membranes were incubated with 5 U/mg adenosine deaminase (ADA) in 50 mM Tris, 2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.4, for 30 min at 25°C, in order to eliminate endogenous adenosine from membrane preparations. Then, plasma membrane extracts (50-70 µg of protein) were incubated with the specific selective A_{2A}R antagonist [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. Binding assays were stopped by rapid filtration through Whatman GF/B filters; followed immediately by washing and counting with a Microbeta Trilux liquid scintillation counter (Wallac).

RESULTS

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

It has been previously reported that patients with PD (stages 4-5 of Braak) show an increase in A_{2A}R protein levels (Calon et al., 2004; Varani et al., 2010). In the present study, A_{2A}R protein levels in plasma membrane extracts from post-mortem putamen samples were measured at different Braak PD stages. Interestingly, western blot detected a significant increase of 2.5 fold in A_{2A}R protein levels at early PD stages (1-2 of Braak) as compared with non-affected control individuals. This increase at early Braak stages is comparable to that observed at advanced Braak stages 4-5 (Figure 1A). Similar results were observed with radioligand binding assay using [3H]ZM241385, a selective A_{2A}R antagonist, as radioligand (Figure 1B). [3H]ZM241385-specific binding was saturable and well-fitted to a single binding site model in all control and PD cases tested, and total A_{2A}R levels (B_{max} value) were significantly increased in advanced PD cases (Figure 1B). Therefore, these results indicate upregulation of A_{2A}R protein levels in the putamen of asymptomatic PD patients.

Striatal A_{2A}R mRNA levels are not increased in early PD stages

A_{2A}R mRNA levels were measured along Braak PD stages with TaqMan PCR. Although A_{2A}R protein levels were increased at early Braak stages, non-significant differences were unexpectedly found in A_{2A}R mRNA levels between Braak PD stages 1-2 and age-matched controls (Figure 1C). However, these increases in A_{2A}R mRNA levels were statistically significant in the putamen of PD samples at stages 3-4 of Braak. The discrepancy between A_{2A}R mRNA and protein levels at the early Braak stages studied (1-2) suggests that post-transcriptional mechanisms could be involved in A_{2A}R regulation.

Striatal miR-34b levels are reduced in early PD stages

Due to the discrepancy between A_{2A}R mRNA and protein levels in asymptomatic PD patients, we wanted to gain knowledge about potential post-transcriptional mechanisms that might regulate A_{2A}R expression, such as miRNAs. The in silico analysis using algorithms to predict miRNA target sites such as MiRanda and PICTAR showed the presence of potential binding sites within the 3'UTR of A_{2A}R for miR-34b and miR-34c, two miRNAs found dysregulated in amygdala, substantia nigra, frontal cortex, and cerebellum in PD patients (Miñones-Moyano et al., 2011). The expression levels of miR-34b and miR-34c were analysed by RT-PCR and the results revealed that miR-34b expression was also significantly reduced in the putamen of PD in early Braak stages and along disease progression (Figure 2).

miR-34b controls A_{2A}R protein levels in SH-SY5Y cells

To determine whether A_{2A}R could be a target of miR-34b, we analysed the effect on the endogenous A_{2A}R protein levels in SH-SY5Y by blocking miR-34b function with an anti-miR. In normal growth conditions the transfection of the anti-miR-34b did not show an effect on A_{2A}R protein levels (data not shown). Miñones-Moyano et al. (2011) described how miR-34b/c levels increased in SH-SY5Y under differentiation conditions. In order to increase the levels of endogenous miR-34b, by previously blocking its function with a specific anti-miR, we treated SH-SY5Y cells with 10 µM of retinoic acid (RA). The analysis of miR-34b expression by RT-PCR at different time points after RA treatment showed a statistically significant increase after 96 h (Figure 3A). Interestingly, using these experimental conditions, cells transfected with the anti-miR-34b for 48 hours showed a significant increase in the A_{2A}R protein levels with respect to cells treated with an anti-miR containing a scrambled sequence (scr) (Figure 3B).

In order to demonstrate that miR-34b could bind to the 3'UTR region of A_{2A}R gene (*ADORA2A*) and that it regulates its expression, we performed an in vitro miRNA luciferase reported assay. SH-SY5Y cells were transfected with a reporter vector containing 3'UTR of *ADORA2A* together with an miR-34b mimic or an miR-scr for 48 hours. The specificity of the miR-34b binding was assayed in parallel using 3'UTR of *ADORA2A* reporter where point mutations were introduced in the predicted miR-34b binding sites, within the seed region (pMirTarget-3'UTR-*ADORA2A*-mutated-1 vector) and in the 3' end (pMirTarget-3'UTR-*ADORA2A*-mutated-2 vector) (Figure 3C). The results showed that the presence of the miR-34b mimic yielded a significant reduction in the luciferase activity compared with the scr sequence with the construct containing the 3'UTR-*ADORA2A*. However, the repression was not observed with the reporter 3'UTR-*ADORA2A*-mutated-1 containing the point mutations inside the seed region (Figure 3D). No

significant differences were observed with the pMirTarget-3'UTR-ADORA2A-mutated-2. Overall the results indicate that in vitro, miR-34b binds specifically to the 3'UTR of A_{2A}R and is able to regulate its expression through the predicted target site that involves the miR-34b seed region.

Reduced DNA methylation pattern in striatal ADORA2A of PD

We were interested in ruling out alternative molecular mechanisms playing a role in the pathological ADORA2A expression in PD patients. The percentage of DNA methylation in striatal ADORA2A was determined using the MassARRAY platform of SEQUENOM. ADORA2A gene consists of three exons: exon 1, a non-coding exon which presents 6 tissue-specific isoforms, h1A-h1F (Yu et al., 2004), and two coding exons (exon 2 and 3) separated by a single intron of nearly 7 Kb. The percentage of DNA methylation was analysed in striatal PD (stages 3-4 of Braak) and age-matched samples (Table 1). Three loci located near exon 1E were amplified by PCR after genomic DNA bisulfite conversion treatment (Figure 4A). PCR 1 covered part of the CpG island (CGI) number #1 and CGI#2, PCR 2 matched with part of CGI#2, and PCR 3 the entire CGI#3. Figure 4B shows that CpG sites numbers 9 and 22 in PCR1 presented a statistically significant reduction in their percentage of DNA methylation in PD cases.

DISCUSSION

A_{2A}Rs are more highly expressed in the striatum than anywhere else in the brain, especially to the indirect output pathway, which is extremely important in the control of voluntary movement (Fredholm et al., 2001; Schiffmann et al., 2007). Moreover, according to PET studies, the putamen is the most enriched region for expression of A_{2A}R (Jenner et al., 2009). Interestingly, A_{2A}Rs play out antagonistic interaction with D₂Rs (Ferré et al., 1991). As a result of this interaction, antagonists of A_{2A}Rs have emerged as a leading candidate class of non-dopaminergic anti-parkinsonian agents, putatively facilitating the availability of D₂Rs (Schwarzschild et al., 2006). In fact, clinical trials have proven that A_{2A}Rs antagonists reduce the post-synaptic effects of dopamine depletion and lessen motor symptoms of PD (Chen et al., 2013; Factor et al., 2010; Hauser et al., 2008; LeWitt et al., 2008; Mizuno et al., 2010; Pinna, 2009; Pourcher et al., 2012; Simola et al., 2008; Stacy et al., 2008).

In addition, some studies have shown up-regulation of A_{2A}Rs expression levels in PD patients with dyskinesias, attributing this increase 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., 2010). This issue has been 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), but also in (6-OHDA)-treated rats with intermittent L-dopa treatment (Tomiya et al., 2004).

In the present study, we analyzed the A_{2A}R expression levels in pharmacologically-treated PD patients with different Braak stages and a group of cases without any symptomatology and classified as a Braak stages 1-2 of PD after post-mortem analysis (prodromal PD cases). Interestingly, the results have shown an increase in striatal A_{2A}Rs levels in early Braak PD stages, reinforcing the notion that the upregulation is not due to the effect of L-dopa and/or occurs before the neuronal loss in the substantia nigra. Therefore, we conclude that the upregulation of A_{2A}R levels is an early event in the pathogenesis of PD.

Due to the notable discrepancy between A_{2A}R mRNA and protein levels in cases with Braak PD stages 1-2 we moved towards analysis of A_{2A}R post-transcriptional regulation, such as the role of miRNAs. In a previous global miRNA expression profiling study carried out in cerebral cases with different Braak PD stages, it was reported that miR-34b and miR-34c were downregulated in early PD stages and along disease progression regions examined (Miñones-Miyano et al., 2011). We also found that miR-34b expression is reduced in the putamen of PD, while miR-34c levels remained unaltered. The analysis in silico using algorithms to predict miRNA-binding sites within the 3'UTR region of *ADORA2A* showed putative binding sites for miR-34b. We show that in vitro the reduction of miR-34b levels using an anti-miR increases the endogenous protein levels of A_{2A}R in RA-treated SH-SY5Y cells. The results of the miRNA luciferase assay support the direct effect of miR-34b regulating A_{2A}R levels through its 3'UTR in vitro. Therefore, this analysis suggests that miR-34b represents a putative modulator of A_{2A}R levels in the putamen of PD. In other cellular contexts, the regulation of A_{2A}R mRNA translation in human polymorphonuclear leukocytes by miR-15, miR-16 and miR-214 has also been described (Heyn et al., 2012).

Finally, we were interested in elucidating other molecular mechanisms underlying the upregulation of striatal A_{2A}Rs levels in PD, based on previous studies in our group relating the role of DNA methylation to the regulation of *ADORA2A* expression (Buirra et al., 2010a, 2010b; Villar-Menéndez et al., 2013, 2014). A loss in the percentage of DNA methylation in two CpG sites located in the locus amplified by PCR #1 was found in the 5'UTR region of *ADORA2A* in the putamen of PD patients with respect to age-matched controls (Figure 4B). However, the in silico analysis did not reveal any putative binding site for a transcription factor candidate in these particular loci. The role of methyl-binding proteins (MBDs) regulating gene expression is well

known (Defossez and Stancheva, 2011). Therefore, it is plausible that a loss of MBDs to 5'UTR region of *ADORA2A* would have an impact on the increased striatal A_{2A}Rs levels in PD. In fact, a role for MeCP₂ was described in the baseline expression of this receptor in cell lines (Buirá et al., 2010b). However, this aspect remains unresolved, as chromatin immunoprecipitation assay is not viable using human post-mortem brains (Huang et al., 2006).

In conclusion, this study provides new insights into the control of pathological *ADORA2A* expression in PD. Interestingly, it is clear that increased A_{2A}R levels also occur in prodromal PD as an early event in the pathology, dismissing the role of pharmacological treatment in its regulation. The increase in knowledge about *ADORA2A* expression might be useful for future pharmacological intervention in PD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (CP08/00095) to MB, and by the Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23034) to MM. IVM is the recipient of an IDIBELL predoctoral fellowship and SP received a "Sara Borrell" ISCIII Postdoctoral Fellowship. We thank T. Yohannan for editorial assistance.

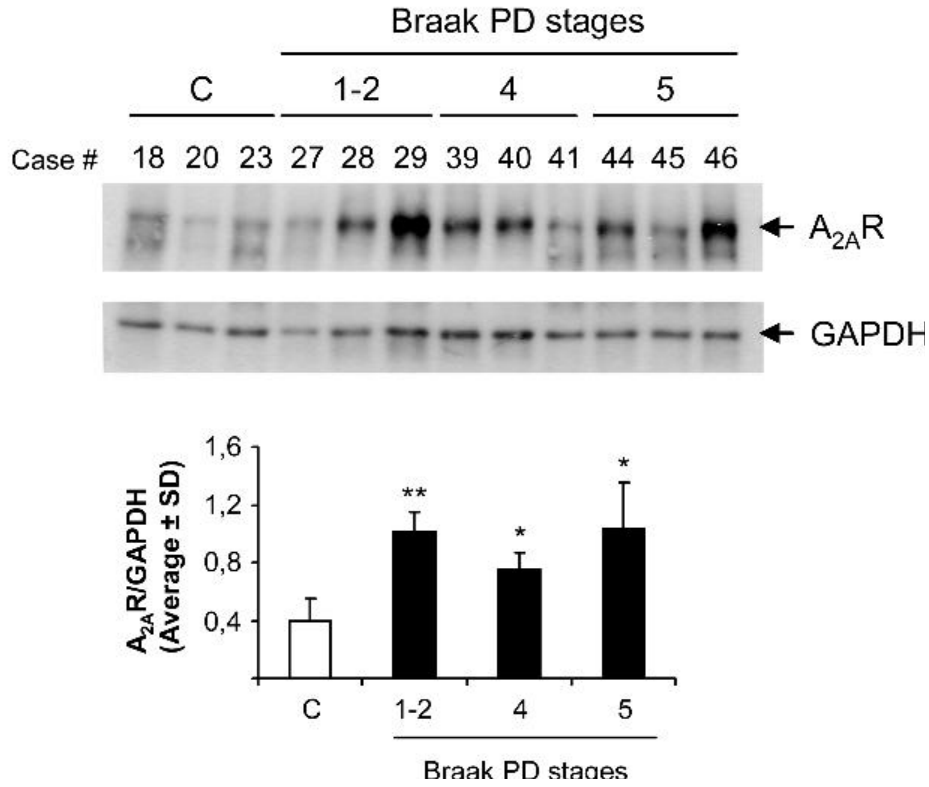
TABLE 1

Case	Disease	Gender	Age (years)	Pm delay	Braak PD stages	A2AR (Western Blot)	A2AR (Binding Assay)	A2AR (TaqMan)	DNA methylation	miR-34b/-34c (real time)
1	CONTROL	F	73	7	0	√			√	
2	CONTROL	F	66	8	0	√		√	√	
3	CONTROL	M	67	5	0	√		√		
4	CONTROL	F	69	2,3	0	√			√	
5	CONTROL	F	46	9,35	0				√	
6	CONTROL	M	59	7	0			√	√	
7	CONTROL	M	61	2,45	0	√	√	√	√	√
8	CONTROL	F	24	6	0				√	
9	CONTROL	M	56	5	0		√	√	√	
10	CONTROL	M	59	6,25	0	√	√		√	
11	CONTROL	M	43	6	0			√	√	
12	CONTROL	M	39	3,3	0				√	
13	CONTROL	M	56	3,5	0	√	√	√	√	
14	CONTROL	M	46	15	0	√				√
15	CONTROL	F	81	4	0			√		
16	CONTROL	M	64	3,3	0	√				
17	CONTROL	F	64	5	0					√
18	CONTROL	F	52	15,4	0	√				√
19	CONTROL	M	66	3,5	0	√				√
20	CONTROL	M	49	9,25	0	√				
21	CONTROL	M	75	7,3	0					√
22	CONTROL	M	66	14	0			√		√
23	CONTROL	M	50	17,15	0	√				
24	CONTROL	M	52	4,4	0	√				
25	CONTROL	F	52	5,45	0	√				
26	CONTROL	M	43	4,35	0		√			
27	Prodromal PD	M	72	8,56	1	√		√		√
28	Prodromal PD	F	77	3,15	1	√		√		√
29	Prodromal PD	M	83	4,3	2	√		√		
30	PD	M	78	10,45	3					√
31	PD	M	57	11	3	√		√	√	
32	PD	F	79	3,3	3-4	√			√	
33	PD	F	65	4	3-4	√			√	
34	PD	F	78	27,3	3-4	√		√	√	
35	PD	F	70	4,3	3-4	√		√		
36	PD	M	79	9,15	4	√			√	
37	PD	M	85	3,15	4	√	√	√		√
38	PD	F	70	5,15	4		√			
39	PD	F	70	4,4	4	√				
40	PD	M	83	4	4	√	√	√		
41	PD	M	50	9,15	4	√				√
42	PD	M	76	4,25	4	√				
43	PD	F	85	6,15	5	√	√		√	√
44	PD	M	76	21,45	5	√				√
45	PD	M	84	16,3	5	√				√
46	PD	F	86	4,1	5	√				√
47	PD	M	71	5,3	5	√		√	√	
48	PD	M	76	9,4	5		√			

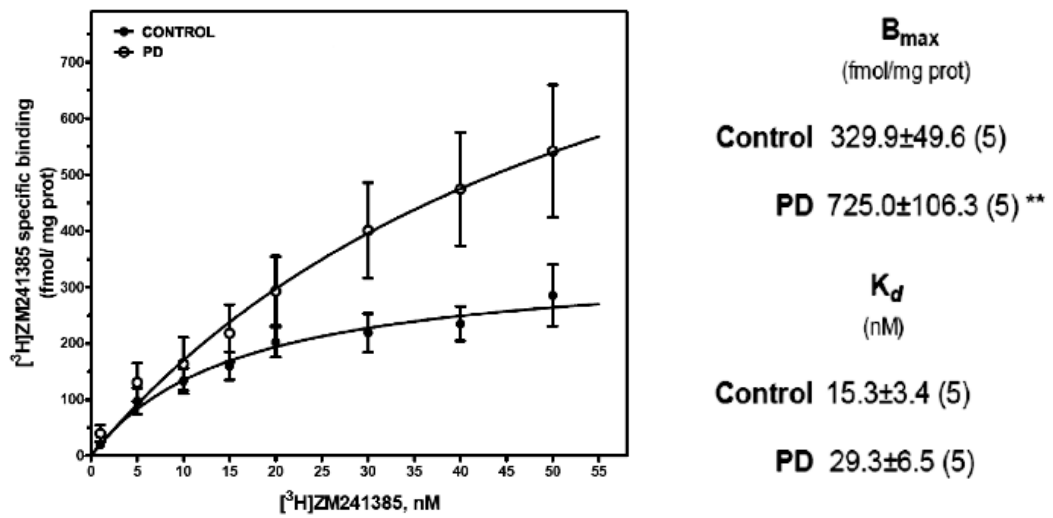
Summary of the main clinical and neuropathological features of human samples studied. M: male, F: female. The technical approximations carried out in every human case are indicated. C: Control, PD: Parkinson's disease. M: male, F: female. Pm delay: post-mortem delay in hours. PD Braak stages referred to Lewy body pathology (Braak et al., 2003).

FIGURE 1

A



B



C

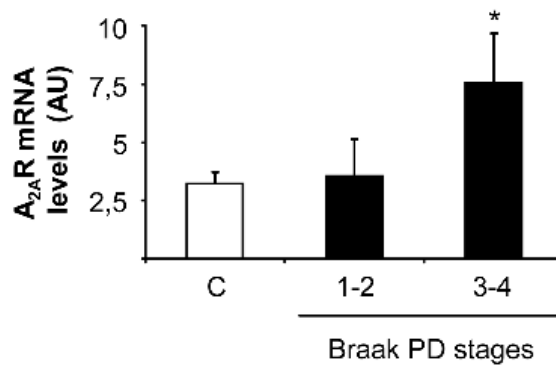


Figure 1 (page 93). Increased A_{2A}R levels are found in the putamen of patients with early PD stages of Braak. (A) Striatal A_{2A}R protein levels (45 kDa) from plasma membrane extracts were detected by western blot. GAPDH (37 kDa) is blotted to control protein loading. The plot shows the densitometric analysis of western blot data. The information for each patient number is found in Table 1 and the image is representative of all the human cases analyzed. (B) Saturation binding curve for specific A_{2A}R measurement in plasma membrane from control and PD cases (stage 4-5 of Braak) using the radioligand [3H]ZM241385. Data are mean ± SEM values from five control cases and five PD cases measured in duplicate. Inset shows a significant increase in maximal specific binding (B_{max}) to A_{2A}R in advanced stage PD cases. (C) Striatal A_{2A}R mRNA levels from total homogenates were analyzed by TaqMan PCR and normalized with β-glucuronidase (GUSB). The graph represents only the mean ± SD of those cases shown in Table 1 with a RIN>7 (Ferrer et al., 2008). AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. *p<0.05 and **p<0.01 compared with control samples. Data were analyzed with Student's t test.

FIGURE 2

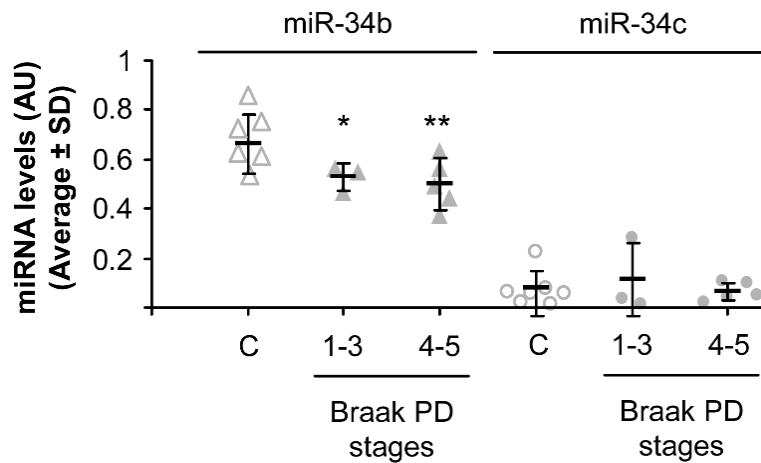


Figure 2. Decreased miR-34b levels are found in the putamen of patients with early PD stages of Braak. Striatal miR-34b and miR-34c levels from total homogenates were analyzed by real time PCR and normalized with SNORD38B. The graph represents only the mean ± SD of those cases shown in Table 1 with a RIN>5.5. AU: Arbitrary Units. C: control; PD: Parkinson's disease. *p<0.05 and **p<0.01 compared with control samples (one-way ANOVA, LSD post-hoc test).

FIGURE 3

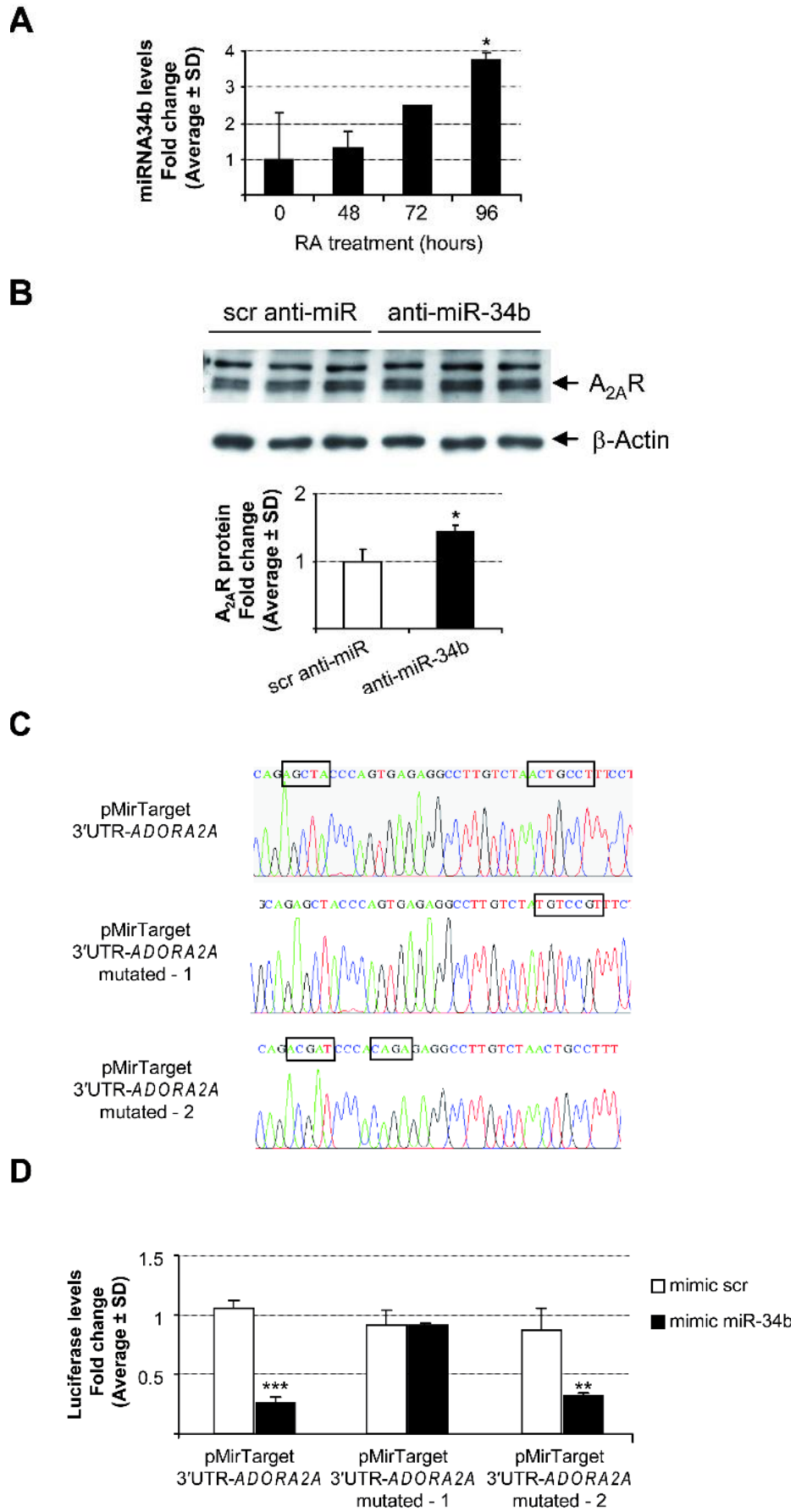


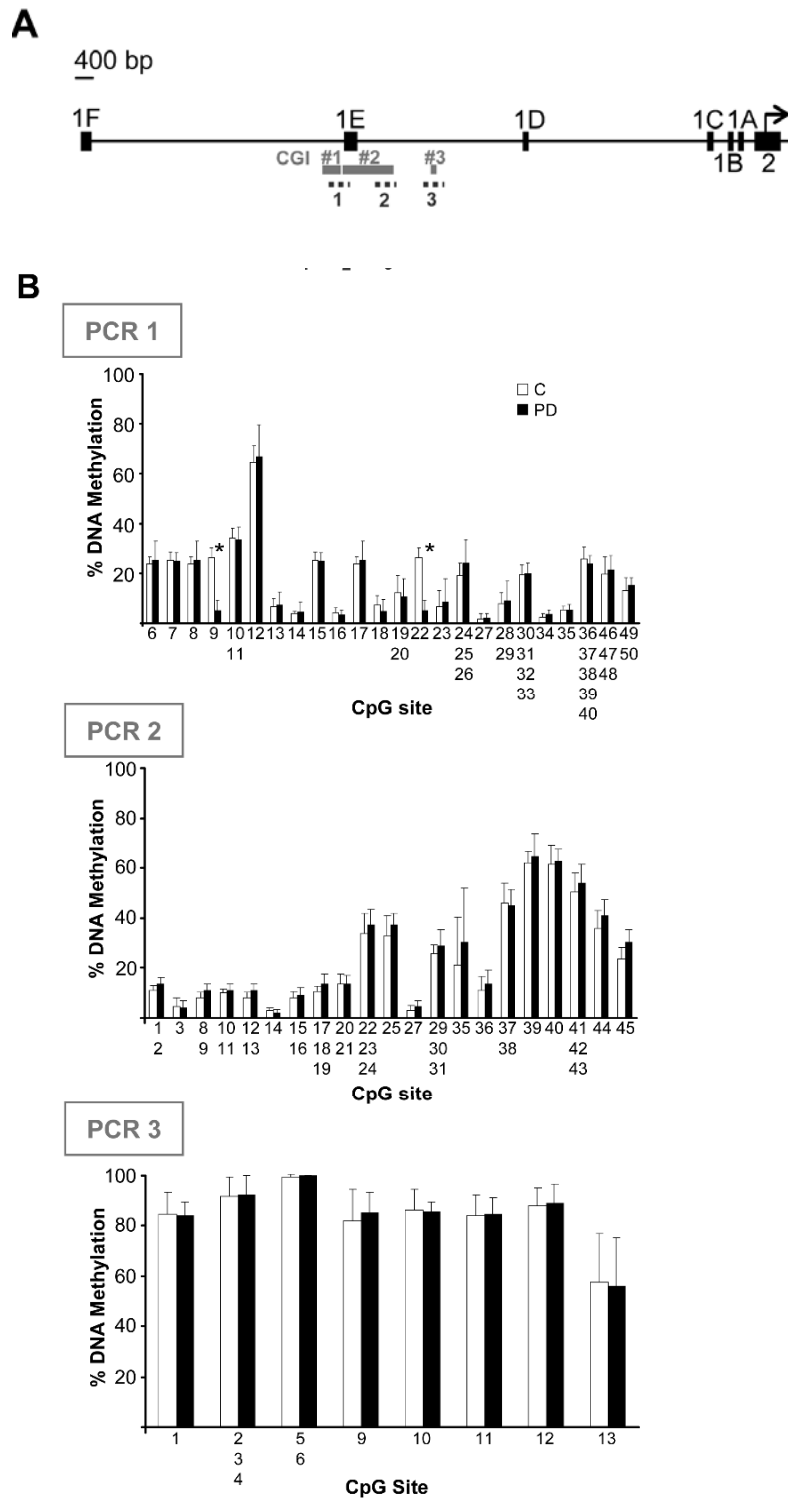
Figure 3 (page 95). The 3'UTR region of *ADORA2A* is a target for miR-34b in SH-SY5Y cells.

(A) The miR-34b levels were measured by real time PCR along a time course in RA-treated SH-SY5Y cells. The data were normalized with SNORD38B. (B) RA treated SH-SY5Y cells were transfected with a specific anti-miR-34b and a random anti-miRNA (scramble: scr) as described in Material and Methods section. A_{2A}R protein levels (45 kDa) were analyzed by western blot, using β -actin (45 kDa) as a control of protein loading. The densitometric analysis is shown below the plot. * $p < 0.05$ compared with scrambled anti-miRNA transfected cells (Student's t test). (C) Partial schematic representation of the 3'UTR region of *ADORA2A* where the miR-34b target sequences were predicted by MiRanda and PICTAR (squares). Electropherograms showing the mutations generated into the 3'UTR region of *ADORA2A* corresponding to the miR-34b target sites predicted by MiRanda and PICTAR; inside (pMirTarget 3'UTR-*ADORA2A*-mutated-1 vector) and outside the seed region of miR-34b (pMirTarget 3'UTR-*ADORA2A*-mutated-2 vector). (D) SH-SY5Y cells were cotransfected with the pMirTarget-3'UTR-*ADORA2A* or pMirTarget-3'UTR-*ADORA2A*-mutated-1/2 vectors with the presence or absence of a mimic for miR-34b, as described in Material and Methods section. *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ compared with scr transfected cells (one-way ANOVA, LSD post-hoc test).

Figure 4 (page 97). The percentage of DNA methylation is reduced in two CpG sites located in 5'UTR region of *ADORA2A* in the putamen of Parkinson's disease patients.

(A) Scaled representation of 5'UTR region of human *ADORA2A* gene established by Yu and co-workers (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., 2010a). 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=12). 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). * $p < 0.001$ compared with control samples (Student's t test).

FIGURE 4



REFERENCES

- Albasanz JL, Rodríguez A, Ferrer I, Martín M. Up-regulation of adenosine A1 receptors in frontal cortex from Pick's disease cases. *Eur J Neurosci* 2007;26:3501-8.
- Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008;18:211-9.
- Angulo E, Casadó V, Mallol J, Canela EI, Viñals F, Ferrer I, Lluís C, Franco R. A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation. *Brain Pathol* 2003;13:440-51.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
- Buira SP, Dentesano G, Albasanz JL, Moreno J, Martín M, Ferrer I, Barrachina M. DNA methylation and Yin Yang-1 repress adenosine A2A receptor levels in human brain. *J Neurochem* 2010a;115:283-95.
- Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I, Barrachina M. DNA methylation regulates adenosine A(2A) receptor cell surface expression levels. *J Neurochem* 2010b;112:1273-85.
- Calon F, Dridi M, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Rajput AH, Di Paolo T. Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 2004;127:1075-84.
- Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2009;29:14741-51.
- Casetta I, Vincenzi F, Bencivelli D, Corciulo C, Gentile M, Granieri E, Borea PA, Varani K. A(2A) adenosine receptors and Parkinson's disease severity. *Acta Neurol Scand.* 2013 Aug 30. doi: 10.1111/ane.12181.
- Chen W, Wang H, Wei H, Gu S, Wei H. Istradefylline, an adenosine A2A receptor antagonist, for patients with Parkinson's Disease: a meta-analysis. *J Neurol Sci* 2013;324:21-8.
- Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal* 2005;1:111-34.
- Defossez PA, Stancheva I. Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2011;101:377-98.
- Factor S, Mark MH, Watts R, Struck L, Mori A, Ballerini R, Sussman NM; Istradefylline 6002-US-007 Study Group. A long-term study of istradefylline in subjects with fluctuating Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16:423-6.
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. 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* 1991;88:7238-41.

Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 2008;9:181-94.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.

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

Hauser RA, Shulman LM, Trugman JM, Roberts JW, Mori A, Ballerini R, Sussman NM; Istradefylline 6002-US-013 Study Group. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. *Mov Disord* 2008;23:2177-85.

Heyn J, Ledderose C, Hinske LC, Limbeck E, Möhnle P, Lindner HA, Kreth S. Adenosine A2A receptor upregulation in human PMNs is controlled by miRNA-214, miRNA-15, and miRNA-16. *Shock*. 2012;37:156-63.

Huang HS, Matevossian A, Jiang Y, Akbarian S. Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *J Neurosci Methods* 2006;156:284-92.

Jellinger KA. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm* 2004;111:1219-35.

Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Rel Disord* 2009;15:406-13.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Rev Genet* 2012;13:484-92.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-8.

LeWitt PA, Guttman M, Tetrud JW, Tuite PJ, Mori A, Chaikin P, Sussman NM; 6002-US-005 Study Group. 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* 2008;63:295-302.

Miñones-Moyano E, Porta S, Escaramís G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, Martí E. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 2011;20:3067-78.

Mishina M, Ishiwata K, Naganawa M, Kimura Y, Kitamura S, Suzuki M, Hashimoto M, Ishibashi K, Oda K, Sakata M, Hamamoto M, Kobayashi S, Katayama Y, Ishii K. Adenosine A(2A) receptors measured with [C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 2011;6:e17338.

Mizuno Y, Hasegawa K, Kondo T, Kuno S, Yamamoto M; Japanese Istradefylline Study Group. Clinical efficacy of istradefylline (KW-6002) in Parkinson's disease: a randomized, controlled study. *Mov Disord* 2010;25:1437-43.

Perez-Buira S, Barrachina M, Rodriguez A, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I. Expression levels of adenosine receptors in hippocampus and frontal cortex in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett* 2007;423:194-9.

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

Pinna A. Novel investigational adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:1619-31.

Pourcher E, Fernandez HH, Stacy M, Mori A, Ballerini R, Chaikin P. Istradefylline for Parkinson's disease patients experiencing motor fluctuations: results of the KW-6002-US-018 study. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:178-84.

Ramlackhansingh AF, Bose SK, Ahmed I, Turkheimer FE, Pavese N, Brooks DJ. Adenosine 2A receptor availability in dyskinetic and nondyskinetic patients with Parkinson disease. *Neurology* 2011;76:1811-6.

Rodríguez A, Martín M, Albasanz JL, Barrachina M, Espinosa JC, Torres JM, Ferrer I. 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* 2006;65:964-75

Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:742-9.

Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007;83:277-92.

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2006;29:647-54.

Simola N, Morelli M, Pinna A. Adenosine A2A receptor antagonists and Parkinson's disease: state of the art and future directions. *Curr Pharm Des* 2008;14:1475-89.

Stacy M, Silver D, Mendis T, Sutton J, Mori A, Chaikin P, Sussman NM. A 12-week, placebo-controlled study (6002-US-006) of istradefylline in Parkinson disease. *Neurology* 2008;70:2233-40.

Stone TW, Ceruti S, Abbracchio MP. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol* 2009;193:535-87.

Tomiyama M, Kimura T, Maeda T, Tanaka H, Kannari K, Baba M. Upregulation of striatal adenosine A2A receptor mRNA in 6-hydroxydopamine-lesioned rats intermittently treated with L-DOPA. *Synapse* 2004;52:218-22.

Varani K, Vincenzi F, Tosi A, Gessi S, Casetta I, Granieri G, Fazio P, Leung E, MacLennan S, Granieri E, Borea PA. A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF- α levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J* 2010;24:587-98.

Villar-Menéndez I, Blanch M, Tyebji S, Pereira-Veiga T, Albasanz JL, Martín M, Ferrer I, Pérez-Navarro E, Barrachina M. Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular Med* 2013;15:295-309.

Villar-Menéndez I, Díaz-Sánchez S, Blanch M, Albasanz JL, Pereira-Veiga T, Monje A, Planchat LM, Ferrer I, Martín M, Barrachina M. Reduced striatal adenosine A2A receptor levels define a molecular subgroup in schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 2014; doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.12.013. [Epub ahead of print]

Yu L, Frith MC, Suzuki Y, Peterfreund RA, Gearan T, Sugano S, Schwarzschild MA, Weng Z, Fink JS, Chen JF. Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res* 2004;1000:156-73.

Artículo publicado I: El aumento de los niveles de 5-Metilcitosina y la reducción de los niveles de 5-Hidroximetilcitosina están asociados con niveles estriatales reducidos del A_{2A}R en la enfermedad de Huntington.

Resumen El receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) es un receptor acoplado a proteína G muy expresado en los ganglios basales. Sus niveles de expresión están fuertemente reducidos en la enfermedad de Huntington (EH), y varias terapias farmacológicas han mostrado su implicación en este trastorno neurodegenerativo. El principal objetivo de este estudio fue estudiar los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen del A_{2A}R (*ADORA2A*) en la EH. Basándose en datos previos publicados por el grupo, medimos el contenido en 5-metilcitosina (5-mC) y 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) en la región 5'UTR del *ADORA2A* en el putamen de pacientes de EH y en el estriado de ratones R6/1 y R6/2 en fases tardías de la enfermedad. En esta zona genómica, los niveles de 5-mC y 5-hmC permanecen inalterados en ambas cepas murinas, aunque los bajos niveles del A_{2A}R estriatal fueron relacionados con reducidos niveles de 5-mC en R6/1 a treinta semanas de edad y con reducidos niveles de 5-hmC en R6/2 a doce semanas de edad en el exón m2. Para analizar si este mecanismo aparece a lo largo de la progresión de la enfermedad, se analizaron los niveles de expresión proteica del A_{2A}R en distintas edades en los ratones R6/1 (8, 12 y 20 semanas de edad). Los niveles de A_{2A}R se ven reducidos a partir de las 12 semanas de edad en adelante, y este descenso es concomitante con la reducción de los niveles de 5-hmC en la región 5'UTR del *ADORA2A*. Cabe resaltar que el incremento en los niveles de 5-mC y la reducción de los niveles de 5-hmC fueron detectados también en la región 5'UTR del *ADORA2A* en el putamen de pacientes de la EH al compararlos con muestras control pertenecientes a personas de edad similar. Por lo tanto, un patrón alterado de metilación del ADN de *ADORA2A* parece jugar un papel en el descenso patológico de la expresión del A_{2A}R descrita en la EH.

Increased 5-Methylcytosine and Decreased 5-Hydroxymethylcytosine Levels are Associated with Reduced Striatal A_{2A}R Levels in Huntington's Disease

Izaskun Villar-Menéndez · Marta Blanch · Shiraz Tyebji · Thais Pereira-Veiga · José Luis Albasanz · Mairena Martín · Isidre Ferrer · Esther Pérez-Navarro · Marta Barrachina

Received: 15 October 2012 / Accepted: 24 January 2013 / Published online: 6 February 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) is a G-protein-coupled receptor highly expressed in basal ganglia. Its expression levels are severely reduced in Huntington's disease (HD), and several pharmacological therapies have shown its implication in this neurodegenerative disorder. The main goal of this study was to gain insight into the molecular mechanisms that regulate A_{2A}R gene (*ADORA2A*) expression in HD. Based on previous data reported by our group, we measured the methylcytosine (5mC) and hydroxymethylcytosine (5hmC) content in the 5'UTR region of *ADORA2A* in the putamen of HD patients and in the striatum of R6/1 and R6/2 mice at late stages of the disease. In this genomic region,

5mC and 5hmC remained unchanged in both mice strains, although low striatal A_{2A}R levels were associated with reduced 5mC levels in 30-week-old R6/1 mice and reduced 5hmC levels in 12-week-old R6/2 mice in exon m2. In order to analyze when this mechanism appears during the progression of the disease, a time course for A_{2A}R protein levels was carried out in R6/1 mice striatum (8, 12, and 20 weeks of age). A_{2A}R levels were reduced from 12 weeks of age onwards, and this downregulation was concomitant with reduced 5hmC levels in the 5'UTR region of *ADORA2A*. Interestingly, increased 5mC levels and reduced 5hmC were found in the 5'UTR region of *ADORA2A* in the putamen of HD patients with respect to age-matched controls. Therefore, an altered DNA methylation pattern in *ADORA2A* seems to play a role in the pathologically decreased A_{2A}R expression levels found in HD.

Izaskun Villar-Menéndez and Marta Blanch: contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12017-013-8219-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Villar-Menéndez · M. Blanch · T. Pereira-Veiga · I. Ferrer · M. Barrachina (✉)
Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital-ICS, (Bellvitge Biomedical Research Institute-) IDIBELL, c/Feixa Llarga s/n, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Spain
e-mail: mbarrachina@idibell.cat

S. Tyebji · E. Pérez-Navarro
Facultad de Medicina, Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

S. Tyebji · E. Pérez-Navarro
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

S. Tyebji · I. Ferrer · E. Pérez-Navarro · M. Barrachina
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, CIBERNED, Madrid, Spain

J. L. Albasanz · M. Martín
Facultad de Ciencia y Tecnologías Químicas, Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas (CRIB), Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

J. L. Albasanz · M. Martín
Facultad de Medicina de Ciudad Real, Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

I. Ferrer
Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

Keywords Adenosine A_{2A} receptor · *ADORA2A* · 5-Methylcytosine · 5-Hydroxymethylcytosine · Huntington's disease

Introduction

Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R) is a G-protein-coupled receptor that stimulates adenylyl cyclase (Fredholm et al. 2001). It is highly expressed in the striatum, especially in the GABAergic medium-sized spiny neurons (MSNs) that express enkephalin (Schiffmann et al. 2007). These cells connect to the external segment of globus pallidus, forming the indirect pathway which is related with motor inhibition, and they are severely affected in Huntington's disease (HD) (Reiner et al. 1988).

Huntington's disease is an autosomal dominant progressive neurodegenerative disorder characterized by motor (chorea), cognitive, and psychiatric abnormalities. It is caused by an expansion of CAG repeat within exon 1 of the Huntingtin gene (HTT). Normal HTT contains 35 or fewer CAG repeats, whereas HD patients present 36 or more repeats in HTT. The CAG repeat length influences the severity and age of onset of the disease (the HD Collaborative Research Group 1993). Five stages (0–4) of disease progression have been established (Vonsattel et al. 1985), characterized by an important neuronal loss in the basal ganglia, including the putamen and caudate nucleus, and the internal and external globus pallidus. In addition to cell death, decreased levels of several neurotransmitter receptors have been detected in the affected brain regions of HD patients and in mouse models of the disease (London et al. 1981; Penney and Young 1982; Van Ness et al. 1982; Young et al. 1988; Richfield et al. 1991; Cha et al. 1999). One of the affected receptors is A_{2A}R, the levels of which are decreased in the putamen and caudate nucleus from early stages of the disease (grade 0) (Whitehouse et al. 1985; Martínez-Mir et al. 1991; Glass et al. 2000). In contrast, high A_{2A}R levels are detected in peripheral blood cells at all HD stages as well as in pre-symptomatic HD patients (Varani et al. 2007).

Some genetic studies reinforce the relationship between A_{2A}Rs and HD pathology, as several polymorphisms in the A_{2A}R gene *ADORA2A* have been linked to age at onset of the disease (Dhaenens et al. 2009; Taherzadeh-Fard et al. 2010). In addition, A_{2A}R activity plays a crucial role in the maintenance of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels, as it recruits TrkB receptors to lipid rafts, promoting its phosphorylation and BDNF-induced modulation (Assaife-Lopes et al. 2010; Tebano et al. 2010). Interestingly, BDNF and TrkB levels are also reduced in the brain of HD patients (Ferrer et al. 2000; Ginés et al. 2006; Zuccato et al. 2008). Additionally, A_{2A}R activity modulates the ubiquitin–proteasome system (Chiang et al. 2009).

All these data strongly implicate A_{2A}R in the pathophysiology of HD. However, the molecular mechanisms leading to A_{2A}R loss in HD are unknown. We previously described how DNA methylation regulates basal *ADORA2A* levels and its expression in several human brain regions (Buirra et al. 2010a, b). DNA methylation (5-methylcytosine, 5mC) is one of the most important mechanisms for epigenetic silencing in mammals, and it occurs predominantly at cytosines that precede guanines in dinucleotide CpG sites. This chemical modification is a normal process that occurs in mammal embryonic development, X-chromosome inactivation, repression of proviral genes, and endogenous transposons (Suzuki and Bird 2008; Jones 2012). 5-Methylhydroxylation (5hmC) has been characterized as a new epigenetic mark; it has been called the sixth base of the genome and has been related to active transcription (Kriacucionis and Heintz 2009; Guo et al. 2011b; Münzel et al. 2011).

In the present report, we show that brains from HD patients, R6/1, and R6/2 mice (Mangiarini et al. 1996; Vonsattel 2008) present reduced striatal A_{2A}R levels related to changes in the content of methylcytosine (5mC) and hydroxymethylcytosine (5hmC) levels in striatal *ADORA2A*.

Materials and methods

Human Brain Samples

The nervous tissue from HD patients used in this research project was provided by the Neurological Tissue Bank, University of Barcelona—Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain. The control human postmortem brain samples were obtained from the brain bank of the Institute of Neuropathology (Hospital of Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). The donation and obtaining of samples were regulated by the ethics committee of both institutions. The sample processing followed the rules of the European Consortium of Nervous Tissues: BrainNet Europe II (BNEII). All the samples were protected in terms of individual donor identification following the BNEII laws. Half of the brains were maintained in 4 % buffered formalin for morphological and immunohistochemical studies, while the other half was processed in coronal sections to be frozen at –80 °C and made available for biochemical studies. The neuropathological examinations were realized in all cases on twenty sections of brain, both cerebellum and brainstem, stained with hematoxylin and eosin, and luxol fast blue-Klüver Barrera, and subjected to immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein, microglial markers, β-amyloid, phosphorylated tau (including antibody AT8), α-synuclein, αB-crystallin, ubiquitin and TDP-43. Control brains were from individuals without

Table 1 Summary of the main clinical and neuropathological features of human samples studied

Sample ID	Vonsattel stage	Gender	Age	Post mortem delay	CAG repeats	WB	MEDIP mC	MEDIP hmC	Bisulfite
Putamen samples from HD patients									
HD1	4	F	28	4 h 15 min	62	✓	✓	✓	✓
HD2	3	M	68	4 h	44	✓	✓	✓	NA
HD3	3	M	72	7 h	42	✓	✓	✓	✓
HD4	3	M	72	17 h	42	–	✓	✓	✓
HD5	4	M	59	5 h 30 min	44	✓	✓	✓	✓
HD6	4	M	60	13 h 05 min	43	–	✓	✓	✓
HD7	3	M	55	15 h	44	✓	–	–	✓
HD8	3–4	M	55	7 h	44	✓	–	–	✓
HD9	1	M	73	7 h	45 ± 2	✓	–	–	✓
HD10	3	M	53	7 h	45 ± 2	–	–	–	✓
Sample ID		Gender	Age	Post mortem delay		WB	MEDIP mC	MEDIP hmC	Bisulfite
Putamen samples from age-matched controls									
C1	CONTROL	M	61	2 h 45 min		✓	✓	✓	NA
C2	CONTROL	M	47	4 h 55 min		–	✓	✓	NA
C3	CONTROL	F	71	8 h 30 min		–	✓	✓	✓
C4	CONTROL	F	55	8 h 30 min		✓	–	–	NA
C5	CONTROL	F	52	15 h 40 min		–	✓	✓	NA
C6	CONTROL	M	66	3 h 5 min		✓	–	–	NA
C7	CONTROL	M	49	9 h 25 min		✓	✓	✓	✓
C8	CONTROL	M	46	15 h		–	–	–	✓
C9	CONTROL	M	66	14 h		✓	–	–	✓
C10	CONTROL	F	68	4 h 30 min		✓	–	–	✓
C11	CONTROL	M	44	6 h 40 min		✓	–	–	✓
C12	CONTROL	M	52	3 h		–	–	–	✓
C13	CONTROL	M	50	17 h 15 min		–	–	–	✓
C14	CONTROL	M	52	4 h 40 min		–	–	–	✓
C15	CONTROL	F	52	5 h 45 min		–	–	–	✓
C16	CONTROL	M	75	7 h 30 min		–	–	–	✓
C17	CONTROL	F	81	4 h		–	–	–	✓

The technical approximations carried out in every human case are indicated

M male, F female, NA no tissue available

neurological history or neuropathological lesions after the standard exam. All cases analyzed are summarized in Table 1.

HD Mouse Models

Genotyping and CAG repeat length determination of male R6/1 and R6/2 heterozygous transgenic mice (B6CBA background) expressing the exon 1 of mutant HTT with 145 and 115 repeats, respectively, were performed as previously described (Giralt et al. 2011). All mice were housed together in numerical birth order in groups of mixed genotypes, and data were recorded for analysis by microchip mouse number. The animals were housed with access to food and water ad libitum in a colony room kept

at 19–22 °C and 40–60 % humidity, under a 12:12 h light/dark cycle. Experiments were conducted in a blind-coded manner with respect to genotype. All procedures were performed in compliance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local Animal Care Committee of *Universitat de Barcelona* (99/01), as well as the *Generalitat de Catalunya* (99/1094).

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Plasma membrane extracts from human postmortem samples were purified as described (Buirea et al. 2010b). Protein concentration was determined with BCA (Pierce, Woburn,

MA, USA) method. For western blot analysis, 10 µg of the resultant supernatant was used as described elsewhere (Buirá et al. 2010b). The following antibodies were used as follows: rabbit polyclonal A_{2A}R (ab3461, Abcam, Cambridge, UK) used at a dilution of 1:1,000 and mouse monoclonal anti-β-actin (clone AC-74, Sigma, Madrid, Spain) diluted 1:10,000.

Mice were killed by cervical dislocation at 8, 12, 20, and 30 weeks (wild type and R6/1) or 12 weeks (wild type and R6/2) of age, and striata were quickly removed and stored at –80 °C until analysis. Total protein extraction was performed as described elsewhere (Saavedra et al. 2010). Protein concentrations were measured using the Dc protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Western blot analysis was performed as previously described (Saavedra et al. 2010). Membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-A_{2A}R antibody (1:1,000; mouse monoclonal, sc-32261, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Loading control was performed by retesting the membranes with anti-α-tubulin (1:50,000; Sigma) for 20 min at room temperature.

TaqMan PCR

TaqMan PCR conditions were the same as previously described (Buirá et al. 2010b). Standard curves for murine *ADORA2A* and γ-tubulin were prepared using serial dilutions of cDNA from wild-type brains. The identification numbers for murine *ADORA2A* and the endogenous control γ-tubulin probes were Mm00802075_m1 and Mm00506159_m1, respectively (Applied Biosystems, Madrid, Spain).

Methylated DNA Immunoprecipitation Assay (MeDIP)

Chromatin shearing (between 200 and 500 bp) was obtained from striatal human and murine genomic DNA, using the Bioruptor™ from Diagenode (Liege, Belgium). The sonicated murine DNA was denatured for 10 min at 98 °C and immediately chilled on ice for 10 min. The resultant human DNA (500 ng) was immunoprecipitated with 2 µg of monoclonal anti-methylcytosine (33D3, Diagenode) or 2 µg of monoclonal anti-hydroxymethylcytosine (Mab-31HMC, Diagenode). The murine DNA (250 ng) was immunoprecipitated with 1.5 µg of a monoclonal anti-methylcytosine (BI-MECY, Eurogentek, Liege, Belgium) or 0.5 µg of rabbit anti-hydroxymethylcytosine (39769, Active Motif, Carlsbad, CA, USA). As a negative control, immunoprecipitation was performed with rabbit and mouse serums (sc-2338 and sc-2025, respectively, Santa Cruz Biotechnology) using the Magnetic LowCell ChIP kit (Diagenode). In parallel, an aliquot of chromatin sheared

from each sample was separated as a loading control of the experiment (input).

The analysis of MeDIPs was performed with real-time PCR using SYBR green technology (Promega, Madrid, Spain) as previously described (Buirá et al. 2010b). The PCR conditions for each locus are indicated in Table 2. The value of the percentage of input was calculated following the instructions provided with the Magnetic Low-Cell ChIP kit (Diagenode).

Bisulfite Sequencing

Genomic DNA was isolated from the putamen of samples (HD patients and age-matched controls) indicated in Table 1 and from the striatum of 12-week-old R6/2 and 30-week-old R6/1 mice as well as their, respectively, wild-type mice, using DNeasy Tissue kit (Qiagen, Madrid, Spain) and following the indications of the supplier. Three hundred nanograms of DNA was used for the bisulfite treatment, using EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, Ecogen, Barcelona, Spain), and under the same conditions previously described (Barrachina and Ferrer 2009). The converted DNA was a template for PCR amplification of the loci indicated in Table 2. Oligos were designed using the MethPrimer software. The PCR product was cloned in pGEM-T vector (Promega), and at least 12–16 clones from each sample were sequenced using the SP6 universal reverse primer (Macrogen, Seoul, Korea).

Results

Striatal A_{2A}R Levels are Reduced in HD Patients and in R6 Mice

A_{2A}R protein levels were measured by western blotting in the putamen of HD patients and age-matched controls (Fig. 1). We detected reduced A_{2A}R protein levels in HD versus control brains, even in an HD case with stage 1 of Vonsattel classification (patient number 9). The verification of mRNA level was not possible as all cases presented suboptimal RNA quality due to the degraded RNA content in the human samples studied (very low RIN numbers), an intrinsic feature of human postmortem brains (Ferrer et al. 2008). In order to attribute reduced striatal A_{2A}R levels to downregulation of its expression, A_{2A}R levels (mRNA and protein) were measured in the striatum of two HD mouse models, R6/1 and R6/2, at late stages of the disease (30 and 12 weeks of age, respectively) when animals presented

Table 2 PCRs carried out in 5' UTR regions of *ADORA2A* to analyze the MeDIP assays and the percentage of striatal 5mC levels in HD patients and R6 mice

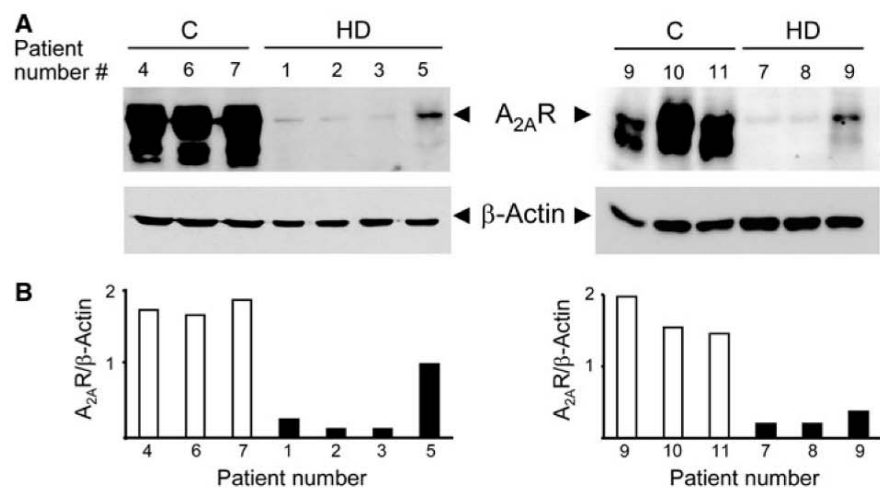
	Position with respect to ATG site (exon 2)	PCR product length (bp)	T (°C)	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
Human MeDIP#1	−10271/−10160*	112	60	GCCAGGATGGTCTCAATCTC	TTTAAGAAGCCCCATTGC
Human MeDIP#2	−8426/−8319*	108	60	CCTTGTTGGAGGGTGAGC	ACCTGGCAATAGGGGAGAAG
Human MeDIP#3	−1367/−1258*	110	60	GTTCCGTACCTGCTTTCTGC	CTGCCTCACCTCCCTCCT
Murine MeDIP#1	−9310/−9211 [#]	100	60	CAGCTTGGGTCATAACAGCA	GCTCCTCCACAAGGCATTAG
Murine MeDIP#2	−1006/−908 [#]	99	60	TGCTGCCTACAAGGTAAGG	ACACTCCCCAGAGCTCCTTT
Murine MeDIP#3	−195/−101 [#]	95	60	GAAGTCATGGTTTCGGGAGA	CAGCCCTTTCCTCACAAGAG
Human Bisulfite #1	−8896/−8480*	417	56	GAGATTTTTTAggTGGAGGAGT	CAACCCTAAATCTCCCTCTT
Human Bisulfite #2	−1314/−739*	576	62	TTAGTTAGGTAGAGGAGTAGGTGGG	CCACTCTAAACTCAAAAACAAAAAT
Murine Bisulfite #1	−9622/−9295 [#]	328	61	TTTTAGAAAGGTTGTGGTTTTGTG	ATTATAACCCAACTACTTCACACCC
Murine Bisulfite #2	+25/+378 [#]	354	56	TGGAGTTGGTTATTGTTGTGTT	CCTACCCTTTATACCCACAAATC

T Annealing temperature, bp base pairs

* ATG location in position 24829373 of NC_000022.10

[#] ATG location in position 75326029 of NC_000076.6

Fig. 1 A_{2A}R levels are reduced in the putamen of HD patients. **a** A_{2A}R protein levels (45 kDa) were measured by western blot in plasma membrane extracts obtained from the putamen of seven HD patients and six age-matched controls. β-actin was used as protein loading control (45 kDa). **b** Densitometric analysis of western blot data. Neuropathological data of all human cases analyzed is detailed in Table 1



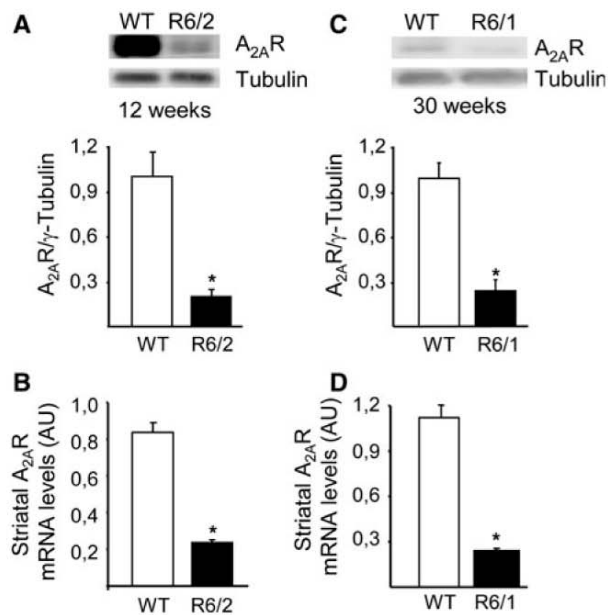


Fig. 2 Reduced striatal $A_{2A}R$ levels in R6 mice striatum at late stages of the disease. $A_{2A}R$ protein levels were analyzed by western blot in **a** 12-week-old R6/2 ($n = 6$) and **c** 30-week-old R6/1 ($n = 3$) mice, and their corresponding controls (12-week-old and 30-week-old wild-type mice; WT, $n = 3$). Tubulin was used as protein loading control (50 kDa). Representative immunoblots are presented, and graphs show the densitometric quantification of western blot data. Striatal $A_{2A}R$ and the endogenous control γ -tubulin mRNA levels were detected by TaqMan PCR in **b** 12-week-old R6/2 ($n = 8$) and **d** 30-week-old R6/1 ($n = 3$) mice. The graph represents the mean \pm standard error of the mean (SEM). AU Arbitrary Units. * $p < 0.001$ compared with age-matched WT mice. Data were analyzed with Student's t test

motor symptoms (Mangiarini et al. 1996; Vonsattel 2008). In both HD mouse models, reduced striatal $A_{2A}R$ protein levels were found in good correlation with decreased mRNA levels (Fig. 2).

The Exon m2 of *ADORA2A* Presents Reduced Striatal 5-Methylcytosine (5mC) Levels in R6/1 Mice at 30 Weeks of Age

We wanted to gain insight into the molecular mechanisms related to the downregulation of striatal $A_{2A}R$ in HD. First, the 5mC levels were measured in a locus surrounding the CpG island (CGI) located in the 5' UTR of *ADORA2A* ($A_{2A}R$ gene) (Fig. 3a, Bisulfite #1) in R6 mice using the bisulfite-sequencing technique. This region was found to be hypomethylated, and no increase in 5mC levels was shown in either R6 mice strain (data not shown). In contrast, the 5mC percentage was reduced in some CpG sites of a locus located in exon m2 (Fig. 3a, Bisulfite #2) in 30-week-old R6/1 mice (Fig. 3b, CpG sites number 2, 6, and 12), while no 5mC loss was found in 12-week-old R6/2 mice (Fig. 3c).

The Exon m2 of *ADORA2A* Presents Reduced Striatal 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) Levels in R6/2 Mice at 12 Weeks of Age

In parallel, the 5hmC levels in the 5' UTR of *ADORA2A* were also measured by methylated DNA immunoprecipitation assay (MeDIP). No changes in 5hmC levels were found in a locus partly covering the CGI located in the 5' UTR of murine *ADORA2A* in both R6 mice strains (Fig. 3d, e, MeDIP #1). The same result was found in a locus covering exons m1B, m1A, and two intronic regions (MeDIP#2), but a reduction in 5hmC levels was found in a region partly covering the exon m2 in R6/2 mice striatum at 12 weeks of age (Fig. 3e, MeDIP #3). In this locus, 5hmC levels remained unchanged in 30-week-old R6/1 mice (Fig. 3d, MeDIP #3).

Changes in 5mC and 5hmC Levels Occur Concomitant with Downregulation of Striatal $A_{2A}R$ Protein Levels in R6/1 Mice

In order to determine whether changes in DNA methylation were the cause or the consequence of reduced striatal $A_{2A}R$ levels, we checked by western blot the protein levels in R6/1 mice striatum at different stages of disease progression (early, 8 week old; middle, 12 week old; late, 20 week old). Reduced striatal $A_{2A}R$ levels were found from 12 weeks of age onwards (Fig. 4a). In parallel, a MeDIP analysis was carried out to measure the 5mC and 5hmC levels in the 5' UTR of murine *ADORA2A* along the three stages of disease progression. No changes in 5mC nor 5hmC were found at 8 weeks of age in any of the loci analyzed (Fig. 4b, c). Interestingly, reduced 5hmC levels were detected in 12-week-old R6/1 mice striatum (Fig. 4c, MeDIP#2), and a reduction of 5mC levels was found at 20 weeks of age (Fig. 4b, MeDIP#2).

The 5' UTR of *ADORA2A* Shows Increased 5mC Levels and Reduced 5hmC Levels in the Putamen of HD Patients

Then, we performed the same analysis in the putamen of HD patients and age-matched controls. 5mC Levels were measured in three loci of the 5' UTR of *ADORA2A* with MeDIP (Fig. 5a). Interestingly, the study revealed a statistically significant increase in 5mC content in a locus covering part of the CGI that is located surrounding the human exon 1E of *ADORA2A* (Yu et al. 2004) (Fig. 5b). Next, the MeDIP assay was verified with the bisulfite-sequencing technique. The sequencing of the locus analyzed in the MeDIP #1 was technically impossible, as this region is highly CpG enriched, which impairs its amplification by PCR after bisulfite treatment. By contrast, MeDIP #2 and #3 were successfully

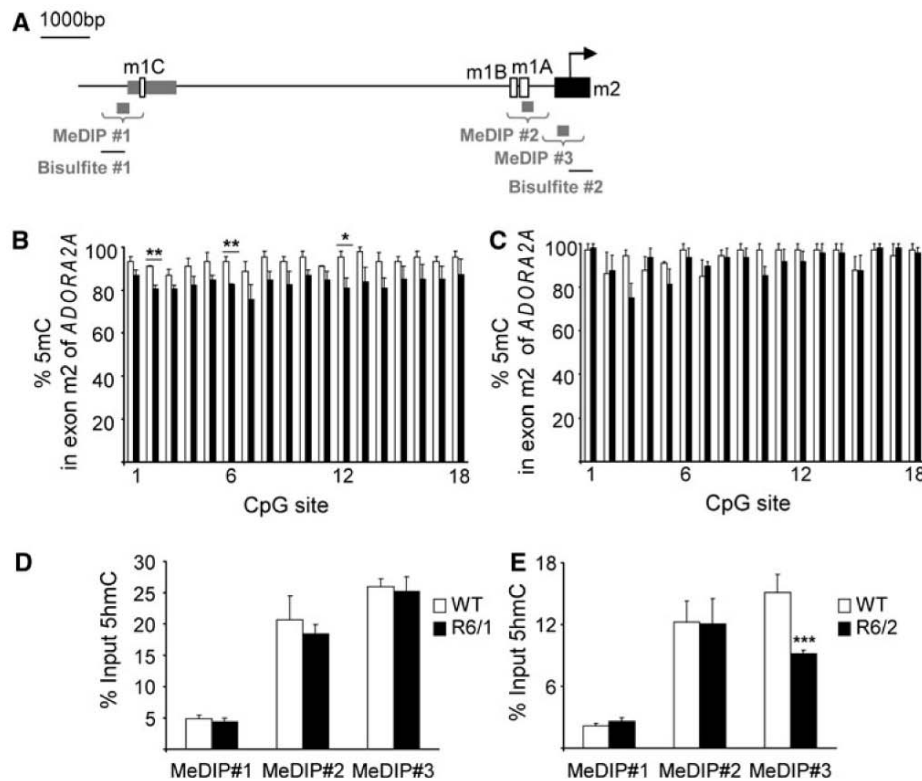


Fig. 3 Reduced 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) content in 30-week-old R6/1 and 12-week-old R6/2 mice, respectively. **a** Scaled representation of 5' UTR region of murine *ADORA2A* gene showing three isoforms of non-coding exon 1 (m1A-m1C, white boxes). *Gray box* the CGI surrounding exon m1C (Yu et al. 2004). The translational start site (ATG) is indicated with an *arrow* and is located in exon m2 (*black box*). **b** The percentage of striatal 5mC levels in exon m2 was determined in 30-week-old wild type (WT; $n = 4$) and 30-week-old R6/1 mice ($n = 4$); and in **c** 12-week-old WT and R6/2 mice ($n = 4$). Twelve clones were sequenced from each animal. The

sequence analyzed is indicated as Bisulfite#2 in diagram A. **d** Three loci were amplified to analyze the immunoprecipitated DNA with an anti-5hmC antibody (MeDIP assay) (see oligos position Table 2). The three regions covered by the PCR analysis (denoted as MeDIP #1, #2 and #3) are indicated in *braces*. Striatal genomic DNA from 30-week-old wild-type ($n = 4$) and R6/1 mice ($n = 4$) and from 12-week-old wild-type ($n = 4$) and R6/2 mice ($n = 12$) were analyzed. Any DNA amplification was detected with the anti-serum (IgG) (data not shown). All plots show the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with age-matched WT mice (Student's *t* test)

amplified in the cases indicated in Table 1. All HD cases presented an increase in 5mC in particular CpG sites, in both loci analyzed with respect to the mean for the age-matched control group (Fig. 6 and Supplemental data, Bisulfite #1 and #2). Moreover, no individual 5mC profile was related with the disease stage, number of CAG repeats, years, or postmortem delay (see Table 1).

Next, an *in silico* analysis was carried out to identify putative transcription factor binding sites in the human loci analyzed. A putative Sp1 binding site was found in both loci mentioned (Fig. 7a and B), whereas a putative CREB binding site was identified in the locus containing exons 1C, 1B, and 1A (Fig. 7b). Both binding sites were located in CpG sites affected by a heterogeneous 5mC increase in HD patients (Fig. 6 and supplemental data).

Finally, 5hmC levels were also determined by MeDIP in the human samples. Interestingly, reduced 5hmC levels were found in two loci analyzed in the putamen of

HD patients compared to age-matched control samples (Fig. 5c).

Discussion

In the present study, we clearly observed a decrease in A_{2A}R protein levels in the putamen of HD patients, even in a case at stage 1 of Vonsattel. The reduction in striatal A_{2A}R levels could be associated to the neuronal loss in this cerebral area. However, striatal neuron death takes place in a heterogeneous fashion (Whitehouse et al. 1985; Martinez-Mir et al. 1991; Glass et al. 2000), and MSNs are present in the brain of old HD patients, despite their high vulnerability to mutant HTT toxicity. Thus, changes in A_{2A}R levels are not simply the result of cell loss (Glass et al. 2000; Hodges et al. 2006; Kuhn et al. 2007; Vonsattel 2008). In accordance, reduced A_{2A}R levels have been also shown in cells expressing mutant

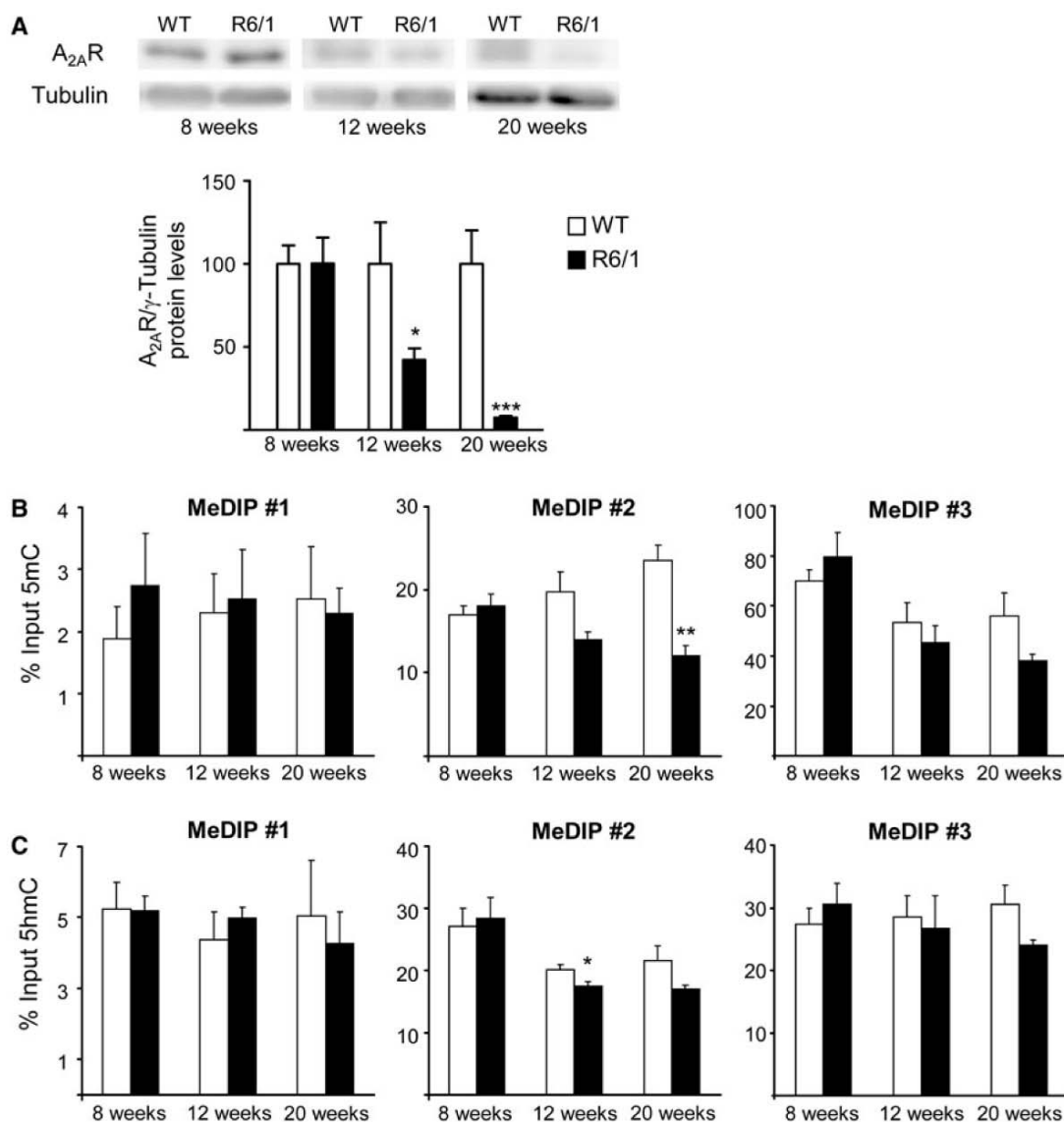


Fig. 4 Time course of 5mC and 5hmC levels in R6/1 mice striatum. **a** Striatal A_{2A}R protein levels were analyzed with western blot in 8- (*n* = 6), 12- (*n* = 6), and 20-week-old R6/1 (*n* = 6) mice, and their corresponding controls (WT; *n* = 5–6). Tubulin was used as protein loading control (50 kDa). Representative immunoblots are presented, and graphs show the densitometric quantification of western blot data. **b** MeDIP analysis was carried out to measure the 5mC and **c** 5hmC levels in the 5' UTR region of murine *ADORA2A* in

R6/1 mice striatum at 8, 12, and 20 weeks of age. The same loci analyzed in Fig. 3a were amplified. Striatal genomic DNA from 8-week-old wild-type (*n* = 6) and 8-week-old R6/1 mice (*n* = 6), 12-week-old wild-type (*n* = 4) and 12-week-old R6/1 mice (*n* = 4), and 20-week-old wild-type (*n* = 4) and 20-week-old R6/2 mice (*n* = 4) were analyzed. Any DNA amplification was detected with the anti-serum (IgG) (data not shown). All plots show the mean ± SEM. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 compared with age-matched WT mice (Student's *t* test)

HTT (Chiang et al. 2005) and in HD animal models that do not show neuronal loss (Cha et al. 1999; Ishiwata et al. 2002; Bauer et al. 2005; Mievis et al. 2011; Orrú et al. 2011). In our study, we also show reduced A_{2A}R mRNA and protein levels in the striatum of R6 mice at late stages of the disease, reinforcing the notion that there is a reduction in the transcription of *ADORA2A*.

We were then interested in exploring the molecular mechanism that could account for A_{2A}R downregulation in

HD. As we have previously shown that DNA methylation regulates basal A_{2A}R levels in human brain (Buirra et al. 2010b), we decided to check the DNA methylation profile of striatal *ADORA2A* in HD. In line with this, very few studies have been focused on the analysis of DNA methylation of genes related with the etiopathology of human neurodegenerative diseases using human postmortem tissue from brain banks (Pieper et al. 2008; Barrachina and Ferrer 2009; Brohede et al. 2010; Jowaed et al. 2010; Matsumoto et al.

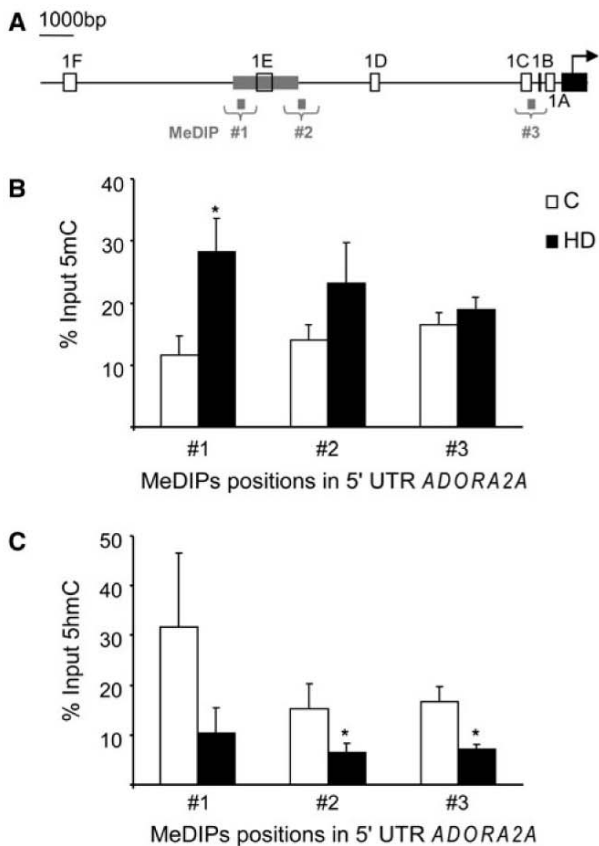


Fig. 5 Increased 5-methylcytosine (5mC) and decreased 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) levels were detected in 5' UTR of *ADORA2A* in the putamen of HD patients. **a** Scaled representation of 5' UTR region of human *ADORA2A* gene showing the 6 isoforms of non-coding exon 1 (1A–1F, white boxes). Gray box indicate the CGI surrounding exon 1E, whose functionality was previously demonstrated (Buira et al. 2010a). The translational start site (ATG) is indicated with an arrow and is located in exon 2 (black box). Three loci were amplified to analyze the immunoprecipitated DNA with **b** anti-5mC and **c** anti-5hmC antibodies (methylated DNA immunoprecipitation assay, MeDIP). Gray boxes the PCR locations (see Table 2), which include analysis of three loci (denoted as MeDIP #1, #2 and #3) indicated in braces. Each bar shows the mean \pm SEM. Neuropathological data of all human cases analyzed are detailed in Table 1. Any DNA amplification was detected with the anti-serum (IgG) (data not shown). * $p < 0.05$ compared with age-matched controls (Student's *t* test)

2010; de Boni et al. 2011; Pietrzak et al. 2011). In this context, to our knowledge there are no existing data regarding the analysis of 5mC and 5hmC levels in genes related to HD.

In the present study, we found an increase in 5mC levels in the striatal 5' UTR of *ADORA2A* in the putamen of HD patients. Moreover, the bisulfite sequencing analysis revealed that this increase occurred in specific CpG sites distributed along the CGI and in a locus covering exons 1C, 1B, and 1A. This analysis also showed a shift in the DNA methylation profile between the two loci analyzed

depending on the HD patient, except for the patient with stage 1 of Vonsattel classification who presented an increase in 5mC in both gene regions (Fig. 6a). Interestingly, the juvenile-onset HD patient showed the highest 5mC levels in nearly all CpG sites located in the sequence covering exons 1C–1A (Fig. 6f, Bisulfite #2). In agreement with these findings, changes in DNA methylation have been reported in postmitotic neurons (Feng et al. 2010). Moreover, it has been demonstrated that neuronal activity modifies the DNA methylation content in genes related to neuronal plasticity in the adult brain (Guo et al. 2011a). Therefore, it is quite plausible that this DNA methylation study reflects a snapshot of every HD patient analyzed in different cerebral activity contexts. In contrast to human samples, in the murine CGI located surrounding exon m1C, there was not found to be an increase in 5mC levels, despite the high homology with the human counterpart exon 1E (Yu et al. 2004). This divergence found between HD and R6 mice striatum may be in accordance with evidence suggesting that DNA methylation is not correlated with sequence conservation and that the genomic context is a critical factor in alteration signatures throughout mammalian brain evolution (Xin et al. 2011). Moreover, the authors argue that the striatum may not be precisely anatomically homologous across the two species, affecting comparative epigenetic study. Likewise, we cannot rule out the possibility that *ADORA2A* may be differentially methylated at regions other than the selected promoter region in R6 mice which have not been covered in the present study. However, it is worth noting that 5mC levels in CpG sites were more homogenous among mice than humans. In this sense, murine phenotypes are more similar between individual mice than between HD patients, as all mice studied were housed in the same conditions and were from the same age. In contrast, HD patients did not share a common life, and drug treatments were not carried out at the same time.

It is noteworthy that in control samples, the locus surrounding the human CGI presented a reduced percentage of 5mC, while the region covering exons 1C–1A showed a higher degree of DNA methylation (Fig. 6, white bars). A similar scenario was observed in wild-type mice at 12 and 30 weeks of age (Fig. 3b, c, white bars). This is in accordance with the typical hypomethylation found in CGIs in somatic cells, while poor CpG regions are highly methylated to confer genomic stabilization (Weber et al. 2007). Finally, although 30-week-old R6/1 mice did not present an increase in 5mC levels in the CGI, a loss of DNA methylation content was shown in exon m2. Moreover, this loss was also shown in a locus covering exons m1B and m1A in R6/1 mice at 20 weeks of age. Interestingly, loss of DNA methylation in exonic regions is also associated with gene repression (Weber et al. 2007; Suzuki and Bird 2008; Jones 2012; Khare et al. 2012). Hence, changes in exons m1B,

Fig. 6 Increased 5-methylcytosine (5mC) levels in the 5' UTR of *ADORA2A* are confirmed by bisulfite sequencing in the putamen of HD patients. Two loci (Bisulfite #1 and #2) were amplified by PCR in bisulfite-treated genomic DNA from six HD patients and five age-matched controls (see Tables 1, 2; Fig. 6). Plots show the percentage of 5mC from 12 to 15 clones analyzed. White bars are the mean \pm standard deviation of age-matched controls while black bars represent the percentage of DNA methylation of individual HD cases: **a** HD9, **b** HD4, **c** HD3, **d** HD5, **e** HD6, and **f** HD1. The rest of the HD cases (HD7, HD8, and HD10) are shown in Supplementary data. The amplified locus located around the CGI covers a genic region proposed as critical in the basal expression of *ADORA2A* (Buirra et al. 2010a)

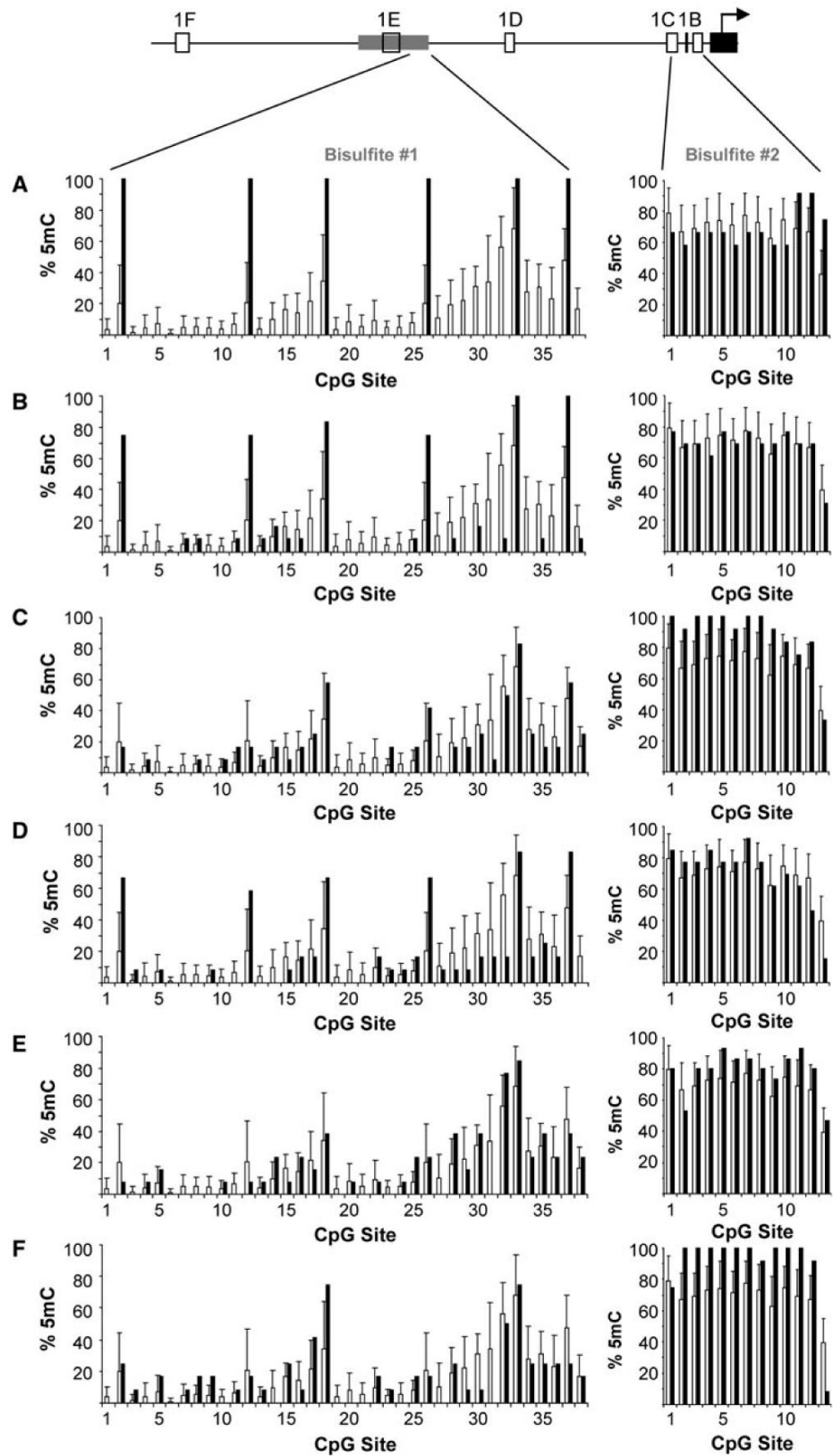
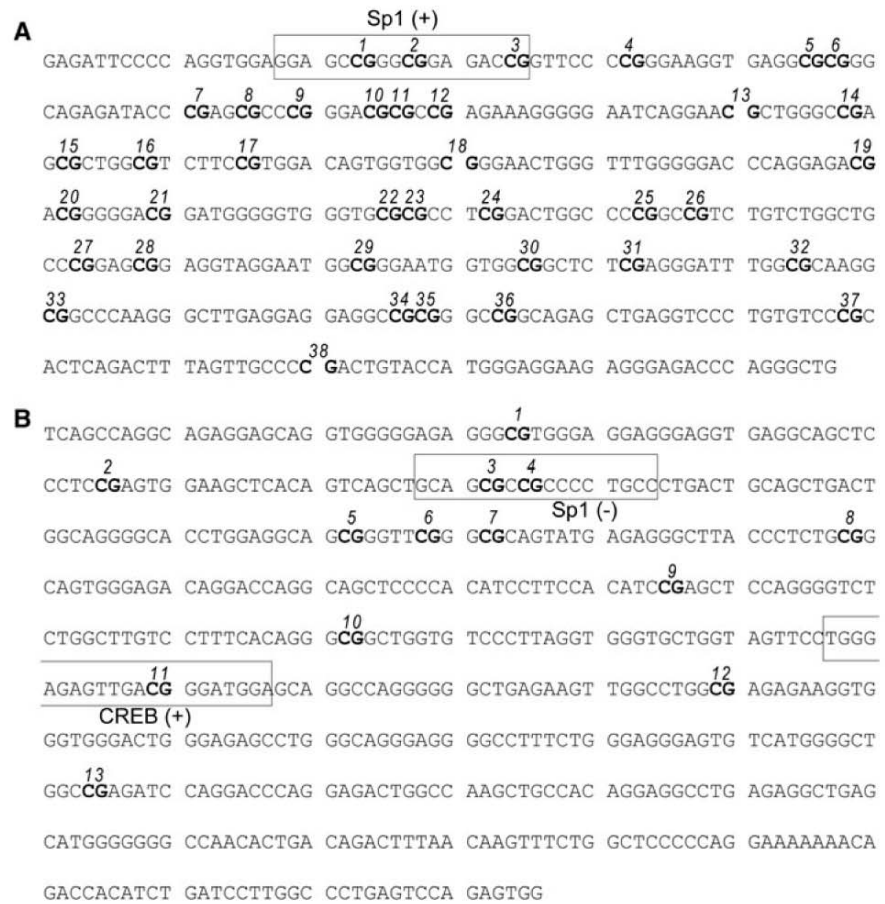


Fig. 7 In silico analysis of the two *ADORA2A* loci sequenced to measure 5mC levels in HD brains. **a** The sequences covering a region of the CGI and **b** a locus covering exons 1C–1A are shown with the CpG sites numbered in *bold*. Binding sites for putative transcription factors, identified using the MatInspector software, are labeled with a *box*. (–) indicates transcription factor binding site in the complementary DNA chain. The genomic positions of both sequences are shown in Table 2 (Human Bisulfite #1 and #2)



m1A, and m2 could be related to decreased A_{2A}R expression.

The in silico analysis in human *ADORA2A* revealed two putative binding sites for Sp1 (Fig. 7a, b) whose activity has been described as being disrupted by interaction with mutant HTT, showing an aberrant binding to specific gene promoters in human HD brains (Li et al. 2002; Chen-Plotkin et al. 2006). Moreover, a potential binding site for cAMP-responsive element binding protein (CREB) covers the CpG site 11 in the poor CpG region analyzed (Fig. 7b), which presented an increase in 5mC in several HD patients (Fig. 6a, e, d). CREB is an activator of *ADORA2A* expression whose activity is also affected by abnormal mutant HTT interaction (Steffan et al. 2000; Chiang et al. 2005; Choi et al. 2012). Interestingly, limited binding of phospho-CREB to methylated target gene promoters has been reported (Yossifoff et al. 2008; Sunahori et al. 2009). Then, an increase in 5mC levels in Sp1 and CREB DNA binding sites might also contribute to the dysfunction attributed to these transcription factors in HD. However, as chromatin immunoprecipitation assay is not viable by using human postmortem brains (Huang et al. 2006), we cannot experimentally validate this statement.

In parallel with increased 5mC levels, we observed a reduction in 5hmC levels in the striatal *ADORA2A* of HD patients. 5hmC, which is the result of 5mC oxidation by the ten-eleven translocation (TET) enzymes (Tahiliani et al. 2009), was identified in Purkinje cells although it is highly abundant in the brain, especially in cerebral regions involved with cognitive functions such as the cortex and the hippocampus (Kriaucionis and Heintz 2009; Münzel et al. 2010; Jin et al. 2011). The biological role of 5hmC is unclear, but it has been suggested as an intermediate step to DNA demethylation (Guo et al. 2011b). In fact, 5hmC has been related to active transcription as its presence inhibits in vitro the binding of methyl-CpG binding proteins and it may also reduce its recognition by the methyltransferase DNMT1 (Valinluck et al. 2004; Valinluck and Sowers 2007; Jin et al. 2010). Moreover, 5hmC is particularly enriched at gene promoters and in gene bodies, and it has been suggested that it may play a role in age-related neurodegeneration as well as in neuronal activity (Globisch et al. 2010; Jin et al. 2011; Song et al. 2011; Szulwach et al. 2011). In addition, gene bodies with 5hmC peaks present higher expression levels than those without 5hmC peaks (Jin et al. 2011). In line with this, MeDIP#3 covers the

analysis of exons 1C–1A in human *ADORA2A* (Fig. 5c), while MeDIP#2 and MeDIP#3 partly cover exon m1B–m1A and exon m2, respectively, in the murine homolog (Figs. 3e, 4c). The MeDIP assays revealed a loss of 5hmC in HD patients and in 12-week-old R6/2 mice. Moreover, we also showed that reduced $A_{2A}R$ protein levels correlated with decreased 5hmC levels in 12-week-old R6/1 mice, which suggests the possibility that changes in DNA methylation pattern are not the consequence of reduced *ADORA2A* expression (Fig. 4a, c). Interestingly, a new function for 5hmC controlling brain mRNA splicing has recently been proposed (Khare et al. 2012). In our study, 12-week-old R6/2 mice did not present any 5mC loss in the exon m2 although 5hmC levels were seen to be reduced. As murine MeDIP#3 covers an exon–intron boundary, reduced 5hmC levels in R6 mice might affect brain $A_{2A}R$ mRNA splicing. Taking together these observations, we propose that loss of 5hmC content in the 5'UTR of *ADORA2A* may play a role in the detected low striatal $A_{2A}R$ levels.

Recently, a new mechanism was suggested as having control over *ADORA2A* expression in HD, based on its regulation by small CAG repeats generated from mutant HTT mRNA and acting like small non-coding RNAs (microRNAs) (Bañez-Coronel et al. 2012). However, the regulation of *ADORA2A* in vitro through this mechanism only achieves a 10 % reduction in endogenous $A_{2A}R$ levels in SH-SY5Y cells expressing mutant HTT. Therefore, it is feasible that complementary mechanisms found in HD brains such as DNA methylation (5mC and 5hmC) may contribute to striatal *ADORA2A* downregulation in this pathology. In addition, transcription factor sequestration by mutant HTT, which represents a broad epigenetic effect across the genome, should be also considered (Steffan et al. 2000; Nucifora et al. 2001; Yu et al. 2002; Cong et al. 2005; Choi et al. 2012).

Finally, several pharmacological studies have revealed the therapeutic potential of $A_{2A}R$ ligands in HD (Popoli et al. 2008; Huang et al. 2011). Since presynaptic $A_{2A}R$ function is not impaired, the negative modulation of its activity has been proposed as a pharmacological target in the treatment of HD patients in light of the control that this receptor exerts on glutamate release (Orrú et al. 2011; Popoli et al. 2002; Blum et al. 2003; Gianfriddo et al. 2004). In contrast, the postsynaptic $A_{2A}R$ blockade might not be beneficial since the genetic deletion of $A_{2A}R$ in an HD transgenic model worsens the symptomatology (Mievis et al. 2011). Consequently, the use of $A_{2A}R$ antagonists in early stages of the disease (modulating presynaptic receptors) and $A_{2A}R$ agonists at later stages (acting above postsynaptic receptors) has been proposed (Popoli et al. 2008). Taking into account all these therapeutical strategies, we identified two molecular mechanisms related to the downregulation of $A_{2A}R$ in the putamen of HD, an increase in 5mC levels, and a reduction

in 5hmC levels in the 5' UTR of human *ADORA2A*. In line with this, a gene therapy strategy designed to increase $A_{2A}R$ levels based on the properties of DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors, which have been shown to be effective in animal models (Miller and Sweatt 2007; Miller et al. 2010; Guo et al. 2011a), might be useful. Therefore, a fuller understanding of *ADORA2A* gene expression regulation will be very useful for application in the design of new, more specific drugs to modulate its expression, and in turn its activity, not only in HD, but also in other neurological diseases with abnormal $A_{2A}R$ s levels such as Parkinson's disease and schizophrenia (Deckert et al. 2003; Calon et al. 2004; Varani et al. 2010; Mishina et al. 2011).

Acknowledgments We are grateful to Dr. Ellen Gelpí for providing HD cases (Neurological Tissue Bank, University of Barcelona—Hospital Clínic de Barcelona) and to Dr. Laura de Jorge (Molecular Genetic Diagnosis Center, IDIBELL) for technical advice in CAG repeat determination. We thank T. Yohannan for editorial assistance. This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III [CP08/00095 to M.B., PI10/01072 to E.P.N.]; and La Fundació La Marató de TV3 [090330 to M.B., 092331 to M.M.]. I.V.M. is the recipient of an IDIBELL predoctoral fellowship and S.T. is a fellow of the Generalitat de Catalunya (AGAUR ST06914).

Conflict of Interest The authors declare no competing financial interests.

References

- Assaife-Lopes, N., Sousa, V. C., Pereira, D. B., Ribeiro, J. A., Chao, M. V., & Sebastião, A. M. (2010). Activation of adenosine A_{2A} receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: Implications for neuromodulation. *The Journal of Neuroscience*, 30(25), 8468–8480.
- Bañez-Coronel, M., Porta, S., Kagerbauer, B., Mateu-Huertas, E., Pantano, L., Ferrer, I., et al. (2012). A pathogenic mechanism in Huntington's disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genetics*, 8(2), e1002481.
- 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.
- Bauer, A., Zilles, K., Matusch, A., Holzmann, C., Riess, O., & von Hörsten, S. (2005). Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation. *Journal of Neurochemistry*, 94(3), 639–650.
- Blum, D., Galas, M. C., Pintor, A., Brouillet, E., Ledent, C., Muller, C. E., et al. (2003). A dual role of adenosine A_{2A} receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: Implications for the neuroprotective potential of A_{2A} antagonists. *The Journal of Neuroscience*, 23(12), 5361–5369.
- Brohede, J., Rinde, M., Winblad, B., & Graff, C. (2010). A DNA methylation study of the amyloid precursor protein gene in several brain regions from patients with familial Alzheimer disease. *Journal of Neurogenetics*, 24(4), 179–181.

- Buira, S. P., Albasanz, J. L., Dentesano, G., Moreno, J., Martín, M., Ferrer, I., et al. (2010a). DNA methylation regulates adenosine A(2A) receptor cell surface expression levels. *Journal of Neurochemistry*, *112*(5), 1273–1285.
- Buira, S. P., Dentesano, G., Albasanz, J. L., Moreno, J., Martín, M., Ferrer, I., et al. (2010b). DNA methylation and Yin Yang-1 repress adenosine A2A receptor levels in human brain. *Journal of Neurochemistry*, *115*(1), 283–295.
- Calon, F., Dridi, M., Hornykiewicz, O., Bédard, P. J., Rajput, A. H., & Di Paolo, T. (2004). Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain*, *127*(Pt 5), 1075–1084.
- Cha, J. H., Frey, A. S., Alsdorf, S. A., Kerner, J. A., Kosinski, C. M., Mangiarini, L., et al. (1999). Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*, *354*(1386), 981–989.
- Chen-Plotkin, A. S., Sadri-Vakili, G., Yohrling, G. J., Braveman, M. W., Benn, C. L., Glajch, K. E., et al. (2006). Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *22*(2), 233–241.
- Chiang, M. C., Chen, H. M., Lai, H. L., Chen, H. W., Chou, S. Y., Chen, C. M., et al. (2009). The A2A adenosine receptor rescues the urea cycle deficiency of Huntington's disease by enhancing the activity of the ubiquitin-proteasome system. *Human Molecular Genetics*, *18*(16), 2929–2942.
- 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.
- Choi, Y. J., Kim, S. I., Lee, J. W., Kwon, Y. S., Lee, H. J., Kim, S. S., et al. (2012). Suppression of aggregate formation of mutant huntingtin potentiates CREB-binding protein sequestration and apoptotic cell death. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *49*(2), 127–137.
- Cong, S. Y., Peppers, B. A., Evert, B. O., Rubinsztein, D. C., Roos, R. A., van Ommen, G. J., et al. (2005). Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *30*(4), 560–571.
- de Boni, L., Tierling, S., Roeber, S., Walter, J., Giese, A., & Kretzschmar, H. A. (2011). Next-generation sequencing reveals regional differences of the α -synuclein methylation state independent of Lewy body disease. *NeuroMolecular Medicine*, *13*(4), 310–320.
- Deckert, J., Brenner, M., Durany, N., Zöchling, R., Paulus, W., Ransmayr, G., et al. (2003). Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *NeuroReport*, *14*(3), 313–316.
- Dhaensens, C. M., Burnouf, S., Simonin, C., Van Brussel, E., Duhamel, A., Defebvre, L., et al. (2009). A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *35*(3), 474–476.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., et al. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience*, *13*(4), 423–430.
- Ferrer, I., Goutan, E., Marín, C., Rey, M. J., & Ribalta, T. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Research*, *866*(1–2), 257–261.
- Ferrer, I., Martínez, 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 and Tissue Banking*, *9*(3), 181–194.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews*, *53*(4), 527–552.
- Gianfriddo, M., Melani, A., Turchi, D., Giovannini, M. G., & Pedata, F. (2004). Adenosine and glutamate extracellular concentrations and mitogen-activated protein kinases in the striatum of Huntington transgenic mice. Selective antagonism of adenosine A2A receptors reduces transmitter outflow. *Neurobiology of Disease*, *17*(1), 77–88.
- Ginés, S., Bosch, M., Marco, S., Gavaldà, N., Díaz-Hernández, M., Lucas, J. J., et al. (2006). Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *The European Journal of Neuroscience*, *23*(3), 649–658.
- Giralt, A., Saaavedra, A., Carreton, O., Xifro, X., Alberch, J., & Perez-Navarro, E. (2011). Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: Role in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *20*(21), 4232–4247.
- Glass, M., Dragunow, M., & Faull, R. L. (2000). The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: A comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience*, *97*(3), 505–519.
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., et al. (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE*, *5*(12), e15367.
- Guo, J. U., Ma, D. K., Mo, H., Ball, M. P., Jang, M. H., Bonaguidi, M. A., et al. (2011a). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neuroscience*, *14*(10), 1345–1351.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011b). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, *145*(3), 423–434.
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., et al. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics*, *15*(6), 965–977.
- Huang, N. K., Lin, J. H., Lin, J. T., Lin, C. I., Liu, E. M., Lin, C. J., et al. (2011). A new drug design targeting the adenosinergic system for Huntington's disease. *PLoS ONE*, *6*(6), e20934.
- Huang, H. S., Matevosian, A., Jiang, Y., & Akbarian, S. (2006). Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *Journal of Neurochemistry Methods*, *156*(1–2), 284–292.
- Ishiwata, K., Ogi, N., Hayakawa, N., Oda, K., Nagaoka, T., Toyama, H., et al. (2002). Adenosine A2A receptor imaging with [¹¹C]KF18446 PET in the rat brain after quinolinic acid lesion: comparison with the dopamine receptor imaging. *Annals of Nuclear Medicine*, *16*(7), 467–475.
- Jin, S. G., Kadam, S., & Pfeifer, G. P. (2010). Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Research*, *38*(11), e125.
- Jin, S. G., Wu, X., Li, A. X., & Pfeifer, G. P. (2011). Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Research*, *39*(12), 5015–5024.
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *13*(7), 484–492.
- Jowaed, A., Schmitt, I., Kaut, O., & Wüllner, U. (2010). Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *The Journal of Neuroscience*, *30*(18), 6355–6359.
- Khare, T., Pai, S., Koncevicus, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., et al. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(10), 1037–1043.

- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 324(5929), 929–930.
- Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A., Strand, A. D., Sengstag, T., Kooperberg, C., et al. (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human Molecular Genetics*, 16(15), 1845–1861.
- Li, S. H., Cheng, A. L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., et al. (2002). Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Molecular and Cellular Biology*, 22(5), 1277–1287.
- London, E. D., Yamamura, H. I., Bird, E. D., & Coyle, J. T. (1981). Decreased receptor-binding sites for kainic acid in brains of patients with Huntington's disease. *Biological Psychiatry*, 16(2), 155–162.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., et al. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, 87(3), 493–506.
- 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.
- Matsumoto, L., Takuma, H., Tamaoka, A., Kurisaki, H., Date, H., Tsuji, S., et al. (2010). CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 5(11), e15522.
- Mievis, S., Blum, D., & Ledent, C. (2011). A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 41(2), 570–576.
- Miller, C. A., Gavin, C. F., White, J. A., Parrish, R. R., Honasoge, A., Yancey, C. R., et al. (2010). Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nature Neuroscience*, 13(6), 664–666.
- Miller, C. A., & Sweatt, J. D. (2007). Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53(6), 857–869.
- Mishina, M., Ishiwata, K., Naganawa, M., Kimura, Y., Kitamura, S., Suzuki, M., et al. (2011). Adenosine A(2A) receptors measured with [C]TMSX PET in the striata of Parkinson's disease patients. *PLoS ONE*, 6(2), e17338.
- Münzel, M., Globisch, D., Brückl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakis, S., et al. (2010). Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(31), 5375–5377.
- Münzel, M., Globisch, D., & Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(29), 6460–6468.
- Nucifora, F. C., Jr, Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., et al. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, 291(5512), 2423–2428.
- Orrú, M., Zanolini, J. M., Quiroz, C., Nguyen, H. P., Guitart, X., & Ferré, S. (2011). Functional changes in postsynaptic adenosine A(2A) receptors during early stages of a rat model of Huntington disease. *Experimental Neurology*, 232(1), 76–80.
- Penney, J. B., Jr, & Young, A. B. (1982). Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington disease. *Neurology*, 32(12), 1391–1395.
- Pieper, H. C., Evert, B. O., Kaut, O., Riederer, P. F., Waha, A., & Wüllner, 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.
- Pietrzak, M., Rempala, G., Nelson, P. T., Zheng, J. J., & Hetman, M. (2011). Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 6(7), e22585.
- Popoli, P., Blum, D., Domenici, M. R., Burnouf, S., & Chern, Y. (2008). A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 14(15), 1500–1511.
- Popoli, P., Pintor, A., Domenici, M. R., Frank, C., Tebano, M. T., Pèzzola, 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*, 22(5), 1967–1975.
- Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., & Young, A. B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15), 5733–5737.
- Richfield, E. K., O'Brien, C. F., Eskin, T., & Shoulson, I. (1991). Heterogeneous dopamine receptor changes in early and late Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 132(1), 121–126.
- Saavedra, A., Garcia-Martinez, J. M., Xifro, X., Giral, A., Torres-Peraza, J. F., Canals, J. M., et al. (2010). PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 contributes to maintain the activation of the PI3 K/Akt pro-survival pathway in Huntington's disease striatum. *Cell Death and Differentiation*, 17(2), 324–335.
- Schiffmann, S. N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R. A., & Ferré, S. (2007). Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Progress in Neurobiology*, 83(5), 277–292.
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., et al. (2011). Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Biotechnology*, 29(1), 68–72.
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., et al. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6763–6768.
- Sunahori, K., Juang, Y. T., & 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. *Journal of Immunology*, 182(3), 1500–1508.
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Review Genetics*, 9(6), 465–476.
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., et al. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1607–1616.
- Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Wiczorek, S., Epplen, J. T., & Arning, L. (2010). Age at onset in Huntington's disease: Replication study on the associations of ADORA2A, HAP1 and OGG1. *Neurogenetics*, 11(4), 435–439.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935.
- Tebano, M. T., Martire, A., Chiodi, V., Ferrante, A., & Popoli, P. (2010). Role of adenosine A(2A) receptors in modulating synaptic functions and brain levels of BDNF: A possible key mechanism in the pathophysiology of Huntington's disease. *ScientificWorldJournal*, 10, 1768–1782.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983.

Artículo publicado II: Niveles reducidos del receptor de adenosina A_{2A} en el estriado definen un subgrupo molecular en esquizofrenia.

Resumen La esquizofrenia es un trastorno mental de etiología desconocida. Algunas evidencias científicas parecen indicar que la esquizofrenia no es una única enfermedad, puesto que existen grupos de pacientes que muestran claras diferencias en cuanto a síntomas, evolución y marcadores de la patología. La esquizofrenia se caracteriza por un estado hiperdopaminérgico relacionado con una elevada actividad del receptor de dopamina D₂. También ha sido propuesta la existencia de un estado hipoadenosinérgico. La adenosina es un nucleósido ampliamente distribuido en el organismo con actividad neuroprotectora y neuromoduladora en el sistema nervioso central. En el cerebro, los receptores de adenosina más abundantes son el A₁R y el A_{2A}R. En el presente trabajo, se ha caracterizado la presencia de ambos receptores en putamen humano postmortem de pacientes afectados por esquizofrenia mediante PCR en tiempo real (TaqMan), western blot y ensayos de unión de radioligando. Se muestra cómo los niveles del A₁R no cambian con respecto a los casos empleados como controles, mientras que aproximadamente el 50% de los pacientes presentan una reducción del A_{2A}R a nivel tanto transcripcional como traducional. Además se describe, mediante tratamiento con bisulfito seguido de secuenciación, cómo la metilación del ADN juega un papel en la expresión patológica del A_{2A}R. Los niveles de 5-metilcitosina están aumentados en los pacientes con reducidos niveles de expresión del receptor. Cabe resaltar la relación que se describe entre el cociente A_{2A}R/ β -actina y ciertos trastornos motores, al compararlo con las escalas de evaluación PANSS, AIMS y SAS. Este resultado indica la posible existencia de un subgrupo de pacientes de esquizofrenia que presentan niveles reducidos del A_{2A}R en el estriado, acompañados de un fenotipo de alteración motora.



Reduced striatal adenosine A_{2A} receptor levels define a molecular subgroup in schizophrenia

Izaskun Villar-Menéndez^a, Sara Díaz-Sánchez^{b,c}, Marta Blanch^a, José Luis Albasanz^{b,c},
Thais Pereira-Veiga^a, Alfonso Monje^{d,1}, Luis Maria Planchat^d, Isidre Ferrer^{a,e,f},
Mairena Martín^{b,c}, Marta Barrachina^{a,f,*}

^a Institute of Neuropathology, Bellvitge University Hospital-ICS, [Bellvitge Biomedical Research Institute-] IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

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

^c Departamento de Química Inorgánica, Orgánica y Bioquímica, Facultad de Medicina de Ciudad Real, CRIB, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

^d Banc de Teixits Neurològics-Parc Sanitari Sant Joan de Déu, CIBERSAM, Sant Boi de Llobregat, Spain

^e Departament de Patologia i Terapèutica Experimental, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2013
Received in revised form
13 November 2013
Accepted 20 December 2013

Keywords:

ADORA2A
Adenosine A(2A) receptor
Motor disturbances
PANSS
5-Methylcytosine
Postmortem
Schizophrenia
Putamen

ABSTRACT

Schizophrenia (SZ) is a mental disorder of unknown origin. Some scientific evidence seems to indicate that SZ is not a single disease entity, since there are patient groups with clear symptomatic, course and biomarker differences. SZ is characterized by a hyperdopaminergic state related to high dopamine D₂ receptor activity. It has also been proposed that there is a hypoadenosynergic state. Adenosine is a nucleoside widely distributed in the organism with neuromodulative and neuroprotective activity in the central nervous system. In the brain, the most abundant adenosine receptors are A₁R and A_{2A}R. In the present report, we characterize the presence of both receptors in human postmortem putamens of patients suffering SZ with real time TaqMan PCR, western blotting and radioligand binding assay. We show that A₁R levels remain unchanged with respect to age-matched controls, whereas nearly fifty percent of patients have reduced A_{2A}R, at the transcriptional and translational levels. Moreover, we describe how DNA methylation plays a role in the pathological A_{2A}R levels with the bisulfite-sequencing technique. In fact, an increase in 5-methylcytosine percentage in the 5' UTR region of ADORA2A was found in those SZ patients with reduced A_{2A}R levels. Interestingly, there was a relationship between the A_{2A}/β-actin ratio and motor disturbances as assessed with some items of the PANSS, AIMS and SAS scales. Therefore, there may be a subgroup of SZ patients with reduced striatal A_{2A}R levels accompanied by an altered motor phenotype.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia (SZ) is a severe mental disorder affecting approximately 1% of the world's population, characterized by

positive (such as hallucinations and delusions), negative (such as social withdrawal and apathy) and cognitive (such as deficits in attention and working memory) symptoms. The causes of this psychiatric disorder are mostly unknown. A replicated finding in the disorder is a small but significant reduction in brain volume and a loss of neuronal processes and synaptic connectivity (Ross et al., 2006). SZ patients have been described as presenting a hyperdopaminergic state in limbic structures that is responsible for psychotic symptoms. The degree of dopamine release correlates positively with the severity of positive symptoms, and subjects with SZ have a higher fraction of dopamine D₂ receptor (D₂Rs) occupied by endogenous dopamine than normal control subjects (Howes and Kapur, 2009). However, it has been suggested that not

* Corresponding author. Institute of Neuropathology, [Bellvitge Biomedical Research Institute-] IDIBELL, Bellvitge University Hospital-ICS, Av. Gran Via de L'Hospitalet 199, 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Tel./fax: +34 93 2607215.
E-mail address: mbarrachina@idibell.cat (M. Barrachina).

¹ Present address: Unidad de Convalecencia, Larga Estancia Socio Sanitaria (Clínica Pujadas) y Unitat de Cures Pal·liatives, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, Spain.

only does dopamine contribute to the pathophysiology of SZ, but other neurotransmitter systems such as glutamate and adenosine are implicated as well. In this regard, a glutamatergic hypofunction and a hypoadenosinergic state in SZ are proposed (Boison et al., 2012).

Adenosine is a nucleoside distributed throughout the entire organism as an intermediary metabolite. At the extracellular level, adenosine plays multiple physiologic roles, interacting with specific receptors A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 . The most brain-enriched receptors are A_1 Rs, which are widely distributed, while A_{2A} Rs are found highly enriched in striatal GABAergic medium spiny neurons (Fredholm et al., 2001). Adenosine is considered to be a neuromodulator affecting excitatory and inhibitory processes in the central nervous system. Its activity through A_1 Rs inhibits glutamate release, while the modulation of A_{2A} Rs inhibits dopamine signalling due to the existence of A_{2A} R- D_2 R heterodimers with reciprocal antagonistic activity (Ferré, 1997). The “adenosine hypothesis” in SZ is based on the existence of reduced extracellular adenosine levels that can lead to the hyperdopaminergic state, by reducing A_{2A} R mediated inhibition of dopamine signalling. For this reason, it has been suggested the use of A_{2A} R agonists as a complementary therapy in SZ (Dixon et al., 1999; Lara and Souza, 2000). Moreover, there are clinical observations of increased serum adenosine deaminase activity in SZ patients (Brunstein et al., 2007).

The involvement of A_1 R and A_{2A} Rs in SZ is also supported by data from genetic and post-mortem studies. Some polymorphisms associated with SZ in a Japanese cohort have been described in A_1 R gene (*ADORA1*) (Gotoh et al., 2009) and differences in DNA methylation have been reported in a monozygotic twin pair for SZ (Dempster et al., 2011). The gene coding for A_{2A} R (*ADORA2A*) is located in chromosome 22, which includes two potential SZ loci (Deckert et al., 1997). Likewise, increased A_{2A} R levels have been described in the putamen of SZ patients related to drug treatment (Kurumaji and Toru, 1998; Deckert et al., 2003).

Considering the relevance that adenosine signalling might have in SZ, we wanted to test the protein levels and expression of A_1 Rs and A_{2A} Rs in the putamen of SZ patients using a greater number of human postmortem brains than in previous studies. Moreover, the cohort analyzed presented a complete characterization at the neuropathological, clinical and pharmacological levels.

2. Methods

2.1. Human brain samples

The putamen samples from SZ patients used in this research project were provided by the Sant Joan de Déu Brain Bank (Sant Boi de Llobregat, Barcelona, Spain), and the control samples were obtained from the brain bank of the Institute of Neuropathology (HUB-ICO-IDIBELL Brain Bank, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). The donation and obtaining of samples were regulated by the ethics committee of both institutions. The sample processing followed the rules of the European Consortium of Nervous Tissues: BrainNet Europe II (BNEII). All the samples were protected in terms of individual donor identification following the BNEII laws. Clinical diagnosis of SZ in donor subjects was confirmed pre-mortem with DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th edition) and ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) criteria by clinical examiners. Moreover, donor subjects were also evaluated pre-mortem with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) (Kay et al., 1987), the Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS) (Guy, 1976), the Neurological Evaluation Scale (NES) (Buchanan and Heinrichs, 1989) and the Simpson–Angus Scale (SAS) (Simpson and Angus, 1970). Most donors were hospitalized for more than 40 years and

were re-evaluated every two years to monitor and update their clinical progression. Anatomic pathology exploration of all SZ samples was performed by the Hospital of Bellvitge to identify the degree of certain neurodegenerative diseases as well as other histopathological alterations, as described (Table 1) (Buirá et al., 2010a). The neuropathological diagnoses were made according to well-established criteria for tauopathy and Lewy body disease (Braak et al., 2003, 2006). Control brains were from individuals without neuropathological lesions (samples ID# 1, 2 and 3, Table 1). No SZ cases showed substantia nigra neurodegeneration.

2.2. Protein extraction and western blotting analysis

Experimental procedure and antibodies used were the same as recently described (Villar-Menéndez et al., 2013). Antibodies used were: a rabbit anti- A_1 R polyclonal antibody (ab3460, Abcam, Cambridge, UK) and anti- A_{2A} R polyclonal antibody (ab3461, Abcam, Cambridge, UK), both used at a dilution of 1:1000, and mouse monoclonal anti- β -actin (clone AC-74, Sigma, Madrid, Spain) diluted 1:10,000.

2.3. [3 H]DPCPX and [3 H]ZM 241385 binding assay to plasma membranes

From fifty to seventy μ g of protein (plasma membranes isolated) was used for A_1 R and A_{2A} R binding assays as previously described (Albasanz et al., 2008). Measurements were carried out by triplicate.

2.4. TaqMan PCR

The PCR conditions and TaqMan probe information are the same as previously described (Buirá et al., 2010a). The identification number for human *ADORA2A* TaqMan probe was Hs00169123_m1 (Applied Biosystems, Madrid, Spain). TaqMan probe for β -glucuronidase (*GUSB*) was used for normalization (Hs99999908_m1).

2.5. SNP genotyping

TaqMan SNP genotyping assay for rs2298383 and TaqMan Genotyping Master Mix were purchased from Applied Biosystems. PCRs were carried out using 10 ng of genomic DNA from all SZ brains in 5 μ l reaction volume. The ABI Prism 7900 Sequence Detection System with SDS software 2.1 was used for amplification and allelic discrimination.

2.6. Bisulfite sequencing

Genomic DNA was isolated from the putamen of samples (SZ patients and age-matched controls) indicated in Table 2, using DNeasy Tissue kit (Qiagen, Madrid, Spain), and following the indications of the supplier. 300 ng of DNA was used for the bisulfite treatment, using EZ DNA Methylation kit (Zymo Research, Ecogen, Barcelona, Spain), and under the same conditions previously described (Villar-Menéndez et al., 2013). The converted DNA was a template for PCR amplification of the locus analyzed, which was located at –8896/–8480 with respect to ATG site (24829373 position in NC_000022.10). The primers used were the following: 5'-GAGATTTTGTAGGTGGAGGAGT-3' (Forward) and 5'-CAACCC-TAAATCTCCTCTT-3' (Reverse). Oligos were designed using the MethPrimer software. The PCR product was cloned in pGEM-T vector (Promega, Madrid, Spain) and at least 12–16 clones from each sample were sequenced using the SP6 universal reverse primer (Macrogen, The Netherlands).

Table 1

Summary of the main clinical and neuropathological features of the human samples studied. The drug treatment administrated to each SZ patient is also indicated. TAPs: Typical antipsychotics, AAPs: Atypical antipsychotics, BZD: Benzodiazepines. M: male, F: female. AD: Alzheimer's disease. LBD: Lewy body disease. Dashed sample IDs showed reduced A_{2A}R levels.

	Sample ID#	Clinical manifestation	Postmortem analysis	Gender	Age	Post mortem delay	TAPs	AAPs	BZD	Others
Group A	1	Control	Control	M	66	14 h				
	2	Control	Control	F	68	4 h 30 min				
	3	Control	Control	M	44	6 h 40 min				
	4	Control	Tauopathy	F	75	5 h 35 min				
	5	Control	Tauopathy	M	74	11 h 35 min				
	6	Control	LBD3	M	81	4 h 55 min				
	7	Control	Vascular dementia	F	47	7 h 15 min				
Group B	8	Control	ADII/A	M	65	5 h 15 min				
	9	Control	ADII/O	M	56	7 h 10 min				
	10	Control	ADII/A	F	64	2 h 15 min				
	11	Control	ADII/B	M	72	8 h 45 min				
	12	Control	ADII/A	M	71	5 h 15 min				
Group C	13	Control	ADII/A	F	86	4 h 15 min				
	14	Control	ADIII/A	F	77	11 h 30 min				
	15	Control	ADIII/B	M	85	4 h 45 min				
	16	Control	ADIII/A	F	71	6 h 45 min				
	17	Control	ADIV/C	F	69	8 h 10 min				
	18	Control	ADIV/C	F	81	5 h				
Group D	19	SZ	AD0/C	M	58	2 h				
	20	Residual SZ	–	M	50	1 h	✓	✓	✓	
	21	Residual SZ	Tauopathy	M	93	3 h	✓	✓		
	22	Residual SZ	Tauopathy	M	67	7 h 15 min	✓		✓	Carbidopa + L-dopa
	23	Residual SZ	LBD3	M	81	8 h 15 min	✓			
	24	Catatonic SZ	LBD3	M	67	7 h 30 min	✓	✓	✓	Anticholinergics
	25	Residual SZ	Vascular dementia	M	79	2 h 30 min	✓			Antiepileptics
Group E	26	Residual SZ	ADII/A	M	74	7 h	✓		✓	Antidepressants and anticholinergics
	27	Paranoid SZ	ADII/O	M	69	8 h	✓	✓	✓	Anticholinergics
	28	Residual SZ	ADII	M	87	3 h	✓	✓	✓	
	29	Residual SZ	ADI/B	M	76	5 h 15 min	✓			
	30	Residual SZ	ADI/A	M	89	1 h				
	31	Residual SZ	ADII/A	M	75	6 h	✓			
Group F	32	Residual SZ	ADIII/A	M	80	6 h	✓		✓	
	33	Disorganized SZ	ADIII/O	M	78	7 h	✓		✓	
	34	Residual SZ	ADIII/A	M	90	3 h	✓			
	35	Residual SZ	ADIV/C	M	80	4 h 50 min	✓	✓	✓	
	36	Paranoid SZ	ADIV	M	81	5 h	✓	✓	✓	
	37	Residual SZ	ADIV/B	M	91	3 h	✓			
	38	Residual SZ	ADIII/A	M	76	8 h	✓	✓	✓	Anticholinergic and antiepileptic
	39	Residual SZ	ADIII/C	M	92	2 h		✓	✓	Antidepressants and antiepileptic

2.7. Statistical and data analysis

Data were analyzed with the GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The numerical data obtained from binding and western blotting assays were statistically analyzed using Student-t test. The percentage of DNA methylation was evaluated using 1-way ANOVA (LSD post-hoc test). Pearson *r* correlation coefficient was used to analyse a possible relation between biochemical and clinical data. Differences between mean values were considered statistically significant at *P* < 0.05.

3. Results

Cerebral A₁Rs are widely distributed, while A_{2A}Rs are more concentrated in the striatum than anywhere else in the brain, especially in the caudate putamen and nucleus accumbens (Fredholm et al., 2001; Schiffmann et al., 2007). Moreover, according to PET studies, the putamen is the most enriched region for expression of A_{2A}R (Jenner et al., 2009). For these reasons, and due to the relationship between the putamen and the control of voluntary movement, this cerebral region was chosen to study the expression levels of the two adenosine receptors.

3.1. A_{2A}R and A₁R protein levels in the putamen of SZ patients are differently modulated

The protein levels of A_{2A}R were measured in the putamen of 21 SZ patients (Groups D, E and F) and in 18 age-matched controls (Groups A, B and C) (Table 1). All SZ samples were from patients suffering this neurological disorder, although the postmortem analysis also revealed the presence of several hallmarks typical of Alzheimer's disease (AD) at different Braak and Braak stages or other brain disorders such as Parkinson's disease (PD), tauopathy and vascular dementia (Braak et al., 2003, 2006). However, the SZ patients analyzed did not manifested clinically these pathologies. Therefore, for comparative analysis, we analyzed a case–control paired group with SZ samples and matched controls on the basis of age-related pathologies (such as AD stage, PD stage, tauopathy and vascular dementia). This approach was established in order to rule out the influence of the neurological disorder associated at the neuropathological level. The sample number 20 was the only SZ case which did not have any neurological hallmark and it was compared to samples 1–3 that showed no neuropathological findings (Table 1). Then, based on the postmortem diagnosis, we compared with western blotting A_{2A}R protein levels in a) Group A vs Group D: 1. SZ subgroup with tauopathy vs tauopathy cases, 2. SZ

Table 2

The technical approximations carried out in every human case are indicated. Bold numbers in RIN column (RNA integrity number) indicated RNA ruled out for TaqMan PCR (RIN < 6.5). The SNP rs2298383 is located in the 5' UTR region. Dashed sample IDs showed reduced A_{2A}R levels.

	Sample ID#	WB A _{2A}	WB A ₁	Binding A _{2A}	Binding A ₁	RIN	TAQMAN	SNP rs2298383	Bisulfite
Group A	1	✓				6.1			
	2	✓		✓	✓	8.3	✓		
	3	✓		✓	✓	7.9	✓		
	4	✓		✓	✓	—			
	5	✓		✓	✓	7.4	✓		
	6	✓		✓	✓	7.2	✓		
Group B	7	✓		✓	✓	6.5	✓		
	8	✓	✓	✓	✓	6.9	✓		
	9	✓	✓	✓	✓	7.9	✓		✓
	10	✓	✓	✓	✓	8.1	✓		✓
	11	✓	✓	✓	✓	6.1			✓
	12	✓	✓	✓	✓	6.7	✓		✓
Group C	13	✓	✓	✓	✓	8	✓		
	14	✓	✓	✓	✓	6.3			✓
	15	✓	✓	✓	✓	7.4	✓		✓
	16	✓	✓	✓	✓	6.3			
	17	✓	✓	✓	✓	6.1			✓
	18	✓	✓	✓	✓	6.9	✓		✓
Group D	19	✓		✓	✓	8.2	✓	TT	
	20	✓		✓	✓	7.6	✓	TT	
	21	✓		✓	✓	7.6	✓	CC	
	22	✓		✓	✓	5.5		CT	
	23	✓		✓	✓	8.4	✓	TT	
	24	✓		✓	✓	6.3	✓	CT	
	25	✓		✓	✓	7.5	✓	CT	
Group E	26	✓	✓	✓	✓	6.2	✓	CT	✓
	27	✓	✓	✓	✓	6.7	✓	CT	
	28	✓	✓	✓	✓	6.5	✓	CC	✓
	29	✓	✓	✓	✓	6.7	✓	TT	✓
	30	✓		✓	✓	8	✓	CC	✓
	31	✓	✓	✓	✓	7.6	✓	TT	
Group F	32	✓	✓	✓	✓	4.2		CT	
	33	✓	✓	✓	✓	7.3	✓	TT	
	34	✓	✓	✓	✓	6.1		CT	✓
	35	✓	✓	✓	✓	6.1		CT	✓
	36	✓	✓	✓	✓	5.7		CT	✓
	37	✓	✓	✓	✓	7.9	✓	TT	✓
	38	✓	✓	✓	✓	3.4		TT	
	39	✓		✓	✓	5.6		TT	

samples with PD at stages 3 of Braak and Braak (LBD3) vs LBD3 samples, and 3. SZ case with vascular dementia vs a patient with this neurological disorder (Fig. 1A); b) Group E (SZ cases with AD stages Braak and Braak I-II (ADI-II) vs Group B (ADI-II samples) (Fig. 1B) and, c) Group F (SZ cases with AD stages III-IV) vs Group C (ADIII-IV samples) (Fig. 1C).

As Fig. 1A–C shows, a great reduction in A_{2A}R level was detected in several SZ cases (Patient numbers 20–24, 28, 29 and 36–38). When mean values of A_{2A}R/β-actin ratio obtained from western blots were analysed in the different groups of cases, two sample populations were obtained with normal and low A_{2A}R levels, respectively, in SZ cases (Groups D, E and F) (Fig. 1D). Similar results were obtained when radioligand binding assays were performed, obtaining the same two sample populations in Groups D, E and F of SZ cases (Fig. 1E). These findings were apparently not affected by specific drug treatments in the cohort studied (Table 1, 1-way ANOVA).

In parallel, A₁R levels were also analyzed with both methodologies and no significant changes were found between age-related pathology control and SZ patients groups (Fig. 2).

3.2. Reduced A_{2A}R protein levels are associated with reduced A_{2A}R mRNA levels in the putamen of SZ patients

Next, striatal A_{2A}R mRNA levels were analyzed by TaqMan PCR in the present cohort (Fig. 3). Only a reduced number of cases presented optimal RNA quality based on RNA integrity number

(RIN > 6.5, Table 2), an intrinsic feature of samples from brain banks (Ferrer et al., 2008). A direct relationship between A_{2A}R protein and mRNA levels was observed in most of the cases tested (Fig. 3). Note that patient number 25 with increased A_{2A}R protein levels also presented an increase in mRNA levels (Figs. 1A and 2A). Exceptionally, case 19 presented high amounts of A_{2A}R mRNA levels with respect to age-matched controls, although this did not translate to increased A_{2A}R protein levels (Fig. 1A).

3.3. Reduced A_{2A}R mRNA levels are not associated with the presence of SNP rs2298383 C-allele in ADORA2A

Next, we wanted to gain insight into the molecular mechanisms related to the downregulation of A_{2A}R in the putamen of SZ patients. As the presence of rs2298383 C-allele has been attributed to A_{2A}R gene (ADORA2A) transcription inhibition (Hohoff et al., 2010), we proceeded to its identification in the SZ cohort studied. As Table 2 shows, there was no relationship between the presence of C-allele and reduced A_{2A}R protein levels (1-way ANOVA).

3.4. Reduced A_{2A}R mRNA levels are associated with an increase in 5-methylcytosine content in the 5' UTR region of ADORA2A in the putamen of SZ patients

5-Methylcytosine (5 mC) levels were measured in a locus surrounding the CpG island (CGI) located in the 5' UTR of ADORA2A using

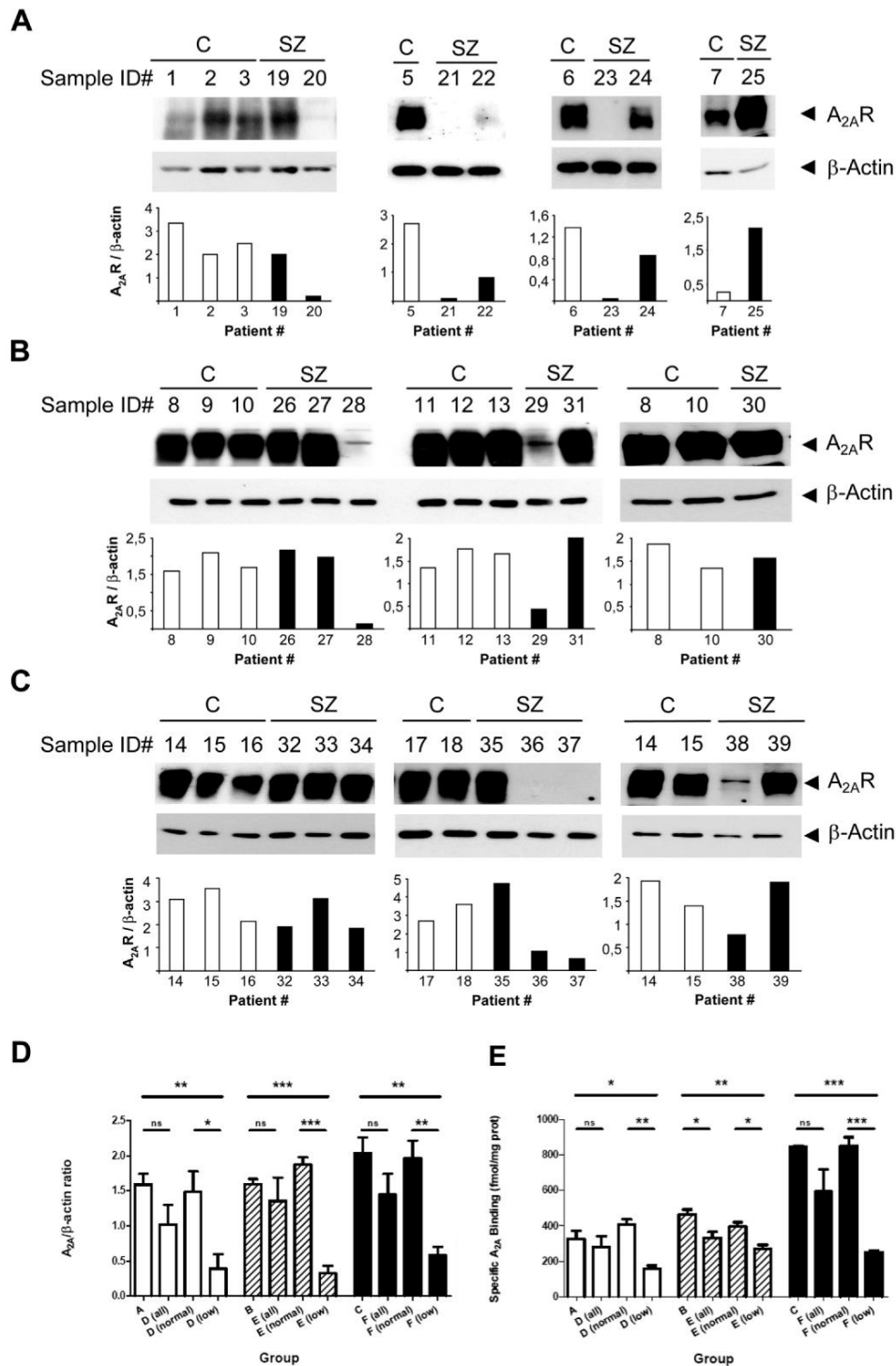


Fig. 1. A subgroup of SZ patients showed reduced striatal $A_{2A}R$ levels. (A) $A_{2A}R$ protein levels (45 kDa) were measured with western blot in plasma membrane extracts obtained from the putamen of SZ patients belonging to group A and D, (B) group B and E, and (C) group C and F (Table 1). β -actin was used as protein loading control (45 kDa). Densitometric analysis of individual cases is shown below each plot. Western blots were repeated twice. (D) Densitometric analysis of all cases analyzed by western blot (Average \pm SEM). (E) Radioligand binding assay for $A_{2A}R$ in cases shown in Table 2. Western blots and radioligand binding assays were carried out using different extract membranes from the same patients. C: control group (age-related pathology), SZ: Schizophrenia.

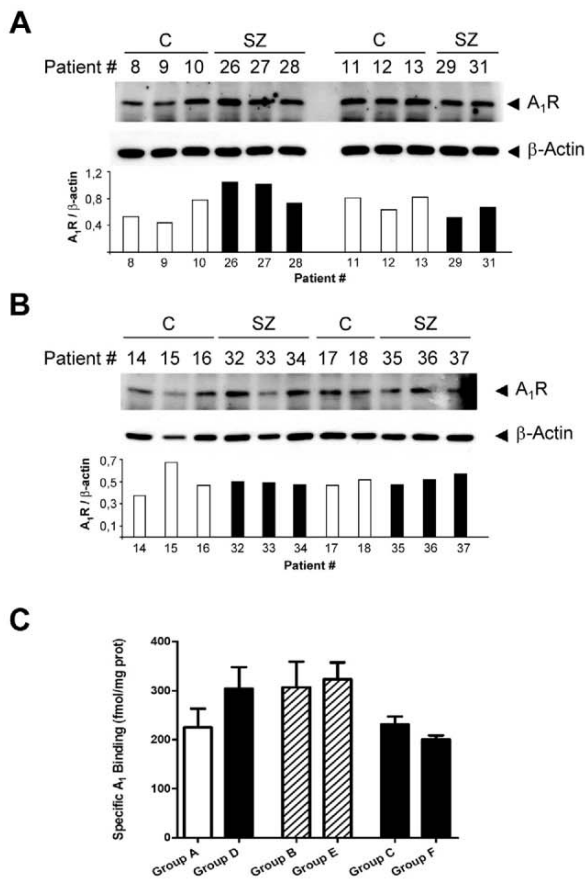


Fig. 2. Striatal A₁R levels remained unchanged in SZ patients. (A) A₁R protein levels (36.5 kDa) were measured with Western blot in plasma membrane extracts obtained from the putamen of SZ patients belonging to group B (white bars) vs group E (black bars) and (B) SZ patients belonging to group C (white bars) vs group F (black bars) (Table 1). β-actin was used as protein loading control (45 kDa). Densitometric analysis of each western blot is shown below each plot. (C) Radioligand binding assay for each group analyzed (Average ± SEM). C: control group (age-related pathology), SZ: Schizophrenia.

the bisulfite-sequencing technique (Fig. 4A). The amplified locus covers a gene region proposed as critical in the baseline expression of *ADORA2A* (Buiria et al., 2010b). Interestingly, the study revealed a statistically significant increase in 5 mC content in particular CpG sites in those SZ cases with reduced striatal A_{2A}R levels (Fig. 4B).

3.5. Reduced A_{2A}R protein levels in the putamen of SZ patients are associated with motor disturbances

A statistical correlation analysis was performed using PANSS values vs western blotting and A_{2A}R specific binding data (Table 3). Interestingly, a negative correlation between A_{2A}R levels and PANSS G4 and G5 values was obtained in both correlation analyses (Table 4). Therefore, low A_{2A}R protein levels in SZ cases are associated with increased PANSS G4 and G5 values (Fig. 5). Next, we decided to explore this correlation using other motor scales involved in the diagnosis of SZ (AIMS, NES and SAS). Some AIMS and SAS values showed a significant correlation with western blot and binding data (Table 3).

4. Discussion

In this report, we differentiated between normal and reduced A_{2A}R levels in the putamen of SZ patients. By contrast, A₁R levels

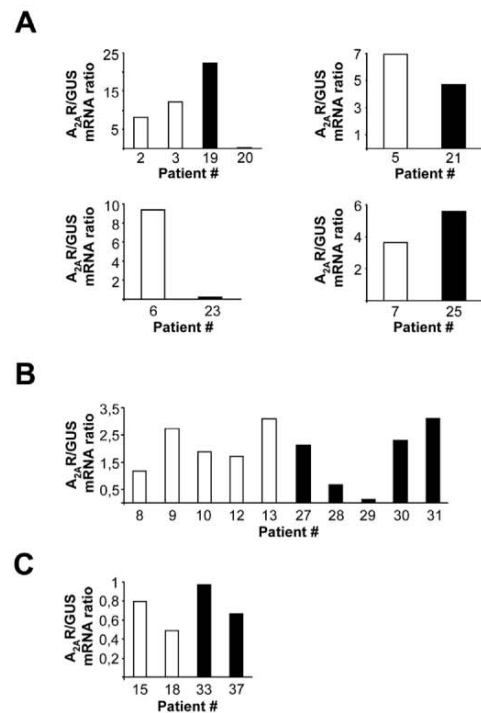


Fig. 3. Relative A_{2A}R mRNA levels in the putamen of SZ patients. (A) Group A (white bars) vs group D (black bars), (B) group B (white bars) vs group E (black bars) and (C) group C (white bars) vs group F (black bars) (Tables 1 and 2). *GUSB* was used as endogenous control gene.

remained unchanged in the entire cohort studied. Yet increased A_{2A}R levels have been related to drug treatment, consistent with data from rodents chronically treated with antipsychotics, clinical trials and postmortem analysis (Parsons et al., 1995; Kurumaji and Toru, 1998; Deckert et al., 2003; Zhang et al., 2012). However, the present cohort studied did not show any relationship among A_{2A}R levels and antipsychotics. In fact, only patient number 25, who also suffered from diabetes, showed increased A_{2A}R levels. Our data contradict two smaller studies based on A_{2A}R radioligand binding assay and devoid of any postmortem neuropathological data (Kurumaji and Toru, 1998; Deckert et al., 2003); the latter did not define the cerebral region analyzed (Deckert et al., 2003). It is worth noting that the present twenty-one SZ samples were analyzed comparing them with respect to the most appropriate control samples. Most SZ samples showed an AD-related pathology, which was asymptomatic, like the other associated pathologies. These postmortem findings are consistent with several postmortem analyses showing that 70–80% of individuals over 65 years present AD-related pathology at the neuropathological level, but most of them would have not developed AD (Ferrer, 2012). Therefore, we performed a comparative study at the neuropathological level, but the final results may be considered as control vs SZ patients from a clinical point of view.

As noted in the Introduction, A_{2A}Rs are highly localized to the basal ganglia and specifically to the indirect output pathway, which is highly important in the control of voluntary movement (Schiffmann et al., 2007). For this reason, we tested whether there was an association between A_{2A}R levels and motor disturbances assessed with the G4 and G5 items of the PANSS scale (G4: Tension/G5: Mannerism and posturing). Interestingly, the subgroup of SZ patients characterized by reduced A_{2A}R levels showed high scores in the G4 and G5 items in the PANSS, as well as motor disturbances measured by the AIMS and SAS scales.

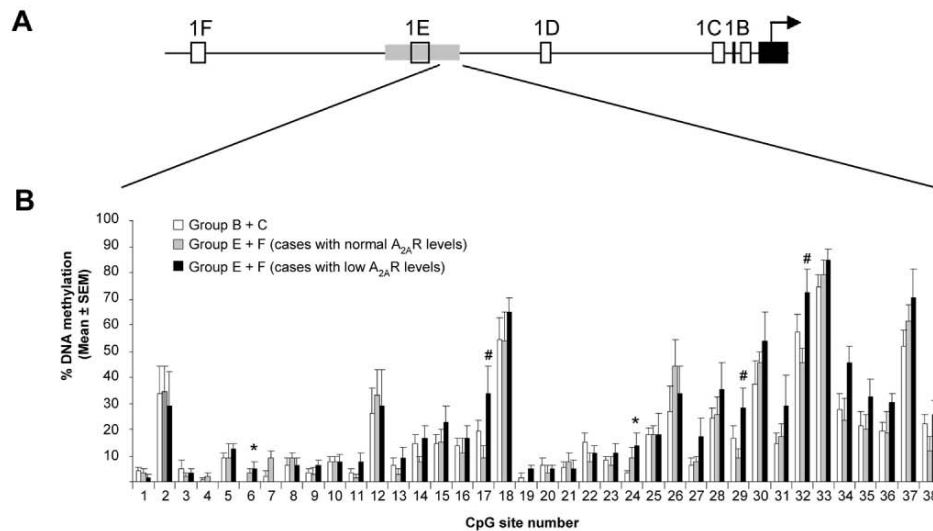


Fig. 4. Reduced striatal $A_{2A}R$ protein levels are associated with increased 5-methylcytosine (5mC) levels in the 5' UTR of *ADORA2A*. (A) Scaled representation of 5' UTR region of human *ADORA2A* gene showing the 6 isoforms of non-coding exon 1 (1A–1F, white boxes). Gray box indicates the CGI surrounding exon 1E. The translational start site (ATG) is indicated with an arrow and is located in exon 2 (black box). (B) The percentage of 5mC levels for control group (group B and C, white bars) with respect to SZ cases (group E and F) with normal (gray bars) and reduced $A_{2A}R$ levels (black bars) is shown. * $p < 0.05$ compared with control group, # $p < 0.05$ compared with cases with normal $A_{2A}R$ levels (one-way ANOVA, LSD post-hoc test). Cases analyzed are indicated in Table 2.

Therefore, we associate a molecular finding with a specific phenotype, thereby establishing a subgroup of SZ. In this sense, the diagnosis of SZ is likely to define a syndrome containing a number of discrete diseases (Peralta and Cuesta, 2001) and motor disturbances that seem to play a role in the neurodysfunction of SZ (Peralta et al., 2010). These motor disturbances have been described in antipsychotic-naïve patients: in a review of 13 studies (Pappa and Dazzan, 2009) there was found to be a median spontaneous dyskinesia rate of 9% and a median spontaneous parkinsonism rate of 17%. Information on akathisia and dystonia was limited. The presence of motor disturbances may be associated with negative symptoms and cognitive dysfunction. Moreover, motor abnormalities seem to be associated with the deficit syndrome in drug-naïve SZ patients (Peralta et al., 2012).

Our findings might represent a personalized pharmacological treatment, as $A_{2A}R$ s can be detected with radioimaging techniques (Mishina et al., 2012). In line with this, patients with reduced $A_{2A}R$ levels might be treated with $A_{2A}R$ agonists in combination with antipsychotics, to potentiate its inhibitor role over D_2R s (Dixon et al., 1999). Recently, the efficacy of adenosine augmentation strategies based on pharmacological inhibition of adenosine kinase and focal augmentation of adenosine by cellular brain grafts of adenosine-releasing cells in mice have been shown (Shen et al., 2012). Moreover, some clinical trials have shown that the modulation of adenosinergic signalling as an adjunctive therapy in antipsychotic-treated SZ patients seems to be beneficial (Akhondzadeh et al., 2000, 2005; Brunstein et al., 2005; Dickerson et al., 2009; Wonodi et al., 2011).

Another possibility to increase $A_{2A}R$ levels might be the use of DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors, as they have been proposed as a potential treatment for SZ (Levenson, 2007). In our study, we showed that the SZ subgroup with reduced $A_{2A}R$ protein levels presented an increase in 5mC levels in the 5' UTR of *ADORA2A*, as occurred in Huntington's disease (Villar-Menéndez et al., 2013). This chemical modification is one of the most important epigenetic mechanisms in gene silencing in mammals (Jones, 2012). Several studies have shown the importance of DNA methylation in the etiology of SZ (Mill et al., 2008; Gavin and

Akbarian, 2012). Likewise, many genes expressed by GABAergic neurons are downregulated in SZ and this may be caused by hypermethylation of their promoters in affected neurons. Examples of this are *GAD67* and *reelin* genes (Veldic et al., 2004; Abdolmaleky et al., 2005). It is noteworthy that increased DNMT1 was found in the cortical and striatal interneurons in SZ, where the *GAD67* gene is suppressed, and in turn, there was an induction of *GAD67* after DNMT inhibitor treatment (Kundakovic et al., 2007).

In the present study, those patients with reduced striatal $A_{2A}R$ could be considered as a group with differing susceptibility to methylation processes, as several clinical studies have proposed (Grayson et al., 2009). This heterogeneity in epigenetic modifications was also observed in a cohort of SZ patients with no hypermethylation in *reelin* gene, which indicates substantial molecular differences among disease cases (Tochigi et al., 2008).

Regarding the effect of antipsychotics on DNA methylation in SZ, mitogen-activated protein kinase 1 gene showed reduced 5mC levels with greater lifetime antipsychotic use (Mill et al., 2008). In this report, we did not detect any relationship between *ADORA2A* methylation and drug treatment. In accordance, high DNMT mRNA levels were found in peripheral blood lymphocytes of SZ patients without any association with antipsychotic treatment (Zhubi et al., 2009).

Therefore, the use of DNMT inhibitors is not a new pharmacological proposal, as several studies have shown the benefits of combined drug treatments (Grayson and Guidotti, 2013), some of them based on antipsychotics and agents that induce DNA demethylation through chromatin remodelling (such as valproic acid) (Guidotti et al., 2009). However, these inhibitors present a wide spectrum of action and their gene specificity needs to be improved.

Finally, our study also has limitations. First, it is well-known that antipsychotics cause motor disturbances, which may mask some relationships between biomarkers and the presence of motor disturbances. However, the differing $A_{2A}R$ levels in the putamen of the cohort studied are not satisfactorily explained by antipsychotic treatment (Table 1). Moreover, a recent study has shown that items G4 and G5 in the PANSS seem to be insensitive to drug effects (Kozłowska et al., 2013). Second, patients had long-lasting

Table 3
Correlation analysis between striatal A2AR levels and PANSS, AIMS, NES and SAS values.

		Correlation analysis between A _{2A} β-actin ratio and PANSS, AIMS, NES and SAS values. Cases with both clinical and biochemical (A _{2A} R detected by western blotting) data available were statistically analyzed by means of a Pearson r correlation coefficient						Correlation analysis between A _{2A} specific binding and PANSS, AIMS, NES and SAS values. Cases with both clinical and biochemical (A _{2A} R detected by radioligand binding) data available were statistically analyzed by means of a Pearson r correlation coefficient					
		Number of cases	Pearson r	95% Confidence interval	P value (one-tailed)	Is the correlation significant? (alpha = 0.05)	R square	Number of cases	Pearson r	95% Confidence interval	P value (one-tailed)	Is the correlation significant? (alpha = 0.05)	R square
PANSS	<i>Global Positive</i>	15	-0.2815	-0.7066 to 0.2929	0.1648	ns	0.0792	14	-0.3929	-0.7642 to 0.1741	0.0823	ns	0.1544
	P1: Delusions	15	-0.3264	-0.7306 to 0.2471	0.1273	ns	0.1066	14	-0.4029	-0.7691 to 0.1626	0.0766	ns	0.1623
	P2: Conceptual disorganisation	15	-0.269	-0.6998 to 0.3053	0.1762	ns	0.0724	14	-0.02848	-0.5508 to 0.5099	0.4615	ns	0.0008
	P3: Hallucinatory behaviour	15	-0.06884	-0.5784 to 0.4794	0.4076	ns	0.0047	14	-0.01209	-0.5393 to 0.5219	0.4836	ns	0.0001
	P4: Excitement	15	-0.2096	-0.6662 to 0.3612	0.236	ns	0.0440	14	-0.2471	-0.6876 to 0.3264	0.1972	ns	0.0610
	P5: Grandiosity	15	0.1423	-0.4201 to 0.6257	0.3138	ns	0.0202	14	-0.3501	-0.7428 to 0.2217	0.1099	ns	0.1226
	P6: Suspiciousness/Persecution	15	-0.3467	-0.7410 to 0.2255	0.1123	ns	0.1202	14	-0.3577	-0.7467 to 0.2135	0.1046	ns	0.128
	P7: Hostility	15	-0.3415	-0.7384 to 0.2311	0.116	ns	0.1166	14	-0.5721	-0.8459 to -0.05945	0.0163	*	0.3273
	<i>Global Negative</i>	15	-0.3226	-0.7286 to 0.2510	0.1303	ns	0.1041	14	0.0985	-0.4560 to 0.5979	0.3688	ns	0.0097
	N1: Blunted effect	15	-0.2149	-0.6692 to 0.3565	0.2303	ns	0.0462	14	0.1685	-0.3978 to 0.6418	0.2824	ns	0.0284
	N2: Emotional withdrawal	15	-0.1755	-0.6460 to 0.3917	0.2743	ns	0.0308	14	0.03295	-0.5066 to 0.5540	0.4555	ns	0.0011
	N3: Poor report	15	-0.4195	-0.7772 to 0.1430	0.0677	ns	0.1760	14	-0.05079	-0.5662 to 0.4932	0.4315	ns	0.0026
	N4: Passive apathetic social withdrawal	15	-0.2307	-0.6783 to 0.3419	0.2138	ns	0.0532	14	0.1948	-0.3746 to 0.6575	0.2523	ns	0.0379
	N5: Difficulty in abstract thinking	15	-0.1986	-0.6598 to 0.3712	0.248	ns	0.0394	14	0.0996	-0.4551 to 0.5986	0.3674	ns	0.0099
	N6: Lack of spontaneity and flow of conversation	15	-0.5722	-0.8460 to -0.05962	0.0162	*	0.3274	14	-0.1091	-0.6048 to 0.4475	0.3552	ns	0.0119
	N7: Stereotypical thinking	15	0.1109	-0.4460 to 0.6059	0.3529	ns	0.0123	14	0.3033	-0.2710 to 0.7184	0.1459	ns	0.0920
	<i>Global General</i>	15	-0.5169	-0.8221 to 0.01900	0.0292	*	0.2672	14	-0.4863	-0.8084 to 0.05981	0.0389	*	0.2365
	G1: Somatic concern	15	0.1096	-0.4471 to 0.6051	0.3545	ns	0.0120	14	-0.3247	-0.7296 to 0.2489	0.1287	ns	0.1054
	G2: Anxiety	15	-0.5527	-0.8377 to -0.03113	0.0202	*	0.3055	14	-0.5625	-0.8419 to -0.04538	0.0181	*	0.3164
	G3: Guilt feelings	15	0.06002	-0.4862 to 0.5725	0.4192	ns	0.0036	14	-0.1781	-0.6476 to 0.3894	0.2712	ns	0.0317
	G4: Tension	15	-0.7292	-0.9084 to -0.3238	0.0015	**	0.5317	14	-0.5384	-0.8315 to -0.01085	0.0235	*	0.2899
	G5: Mannerism and posturing	15	-0.6203	-0.8659 to -0.1335	0.009	**	0.3847	14	-0.4816	-0.8062 to 0.06598	0.0406	*	0.2319
	G6: Depression	15	-0.1202	-0.6119 to 0.4385	0.3412	ns	0.0145	14	-0.0939	-0.5949 to 0.4597	0.3747	ns	0.0088
	G7: Motor retardation	15	0.08211	-0.4690 to 0.5872	0.3901	ns	0.0067	14	0.3731	-0.1965 to 0.7544	0.0944	ns	0.1392
	G8: Uncooperativeness	15	-0.4444	-0.7890 to 0.1130	0.0557	*	0.1975	14	-0.5269	-0.8265 to 0.005232	0.0264	*	0.2776
	G9: Unusual thought content	15	-0.0827	-0.5876 to 0.4685	0.3893	ns	0.0068	14	0.1215	-0.4374 to 0.6127	0.3395	ns	0.0148
	G10: Disorientation	15	-0.3721	-0.7539 to 0.1976	0.0951	ns	0.1385	14	-0.236	-0.6814 to 0.3368	0.2083	ns	0.0557
	G11: Poor attention	15	-0.3592	-0.7474 to 0.2119	0.1036	ns	0.1290	14	-0.3979	-0.7667 to 0.1683	0.0794	ns	0.1583
	G12: Lack of judgement and insight	15	0.0315	-0.5076 to 0.5530	0.4574	ns	0.0010	14	0.5583	0.03926 to 0.8401	0.019	*	0.3117
	G13: Disturbance of volition	15	-0.5201	-0.8235 to 0.01465	0.0283	*	0.2705	14	-0.3458	-0.7406 to 0.2265	0.113	ns	0.1195
	G14: Poor impulse control	15	-0.3709	-0.7533 to 0.1989	0.0958	ns	0.1376	14	-0.4831	-0.8069 to 0.06401	0.0401	*	0.2334
	G15: Preoccupation avoidance	15	0.496	-0.04701 to 0.8128	0.0356	*	0.2461	14	0.4996	-0.04225 to 0.8144	0.0344	*	0.2496
	G16: Active social avoidance	15	-0.5466	-0.8351 to -0.02248	0.0216	*	0.2988	14	-0.232	-0.6791 to 0.3407	0.2124	ns	0.0538
AIMS	Muscles of facial expression	19	0.4757	0.01118 to 0.7713	0.023	*	0.2263	18	0.294	-0.2175 to 0.6788	0.1261	ns	0.0864

Lips and perioral area	19	0.3453	-0.1451 to 0.6995	0.0803	ns	No	0.1192	18	0.3952	-0.1056 to 0.7361	0.0582	ns	No	0.1562
Jaw	19	0.3091	-0.1845 to 0.6782	0.106	ns	No	0.0955	18	0.2847	-0.2271 to 0.6733	0.134	ns	No	0.0811
Tongue	19	0.1781	-0.3150 to 0.5956	0.2397	ns	No	0.0317	18	0.1059	-0.3950 to 0.5582	0.3429	ns	No	0.0112
Upper extremity movements	19	0.0499	-0.4270 to 0.5051	0.4221	ns	No	0.0025	18	0.07505	-0.4209 to 0.5364	0.3873	ns	No	0.0056
Lower extremity movements	19	-0.04403	-0.5007 to 0.4318	0.4311	ns	No	0.0019	18	-0.01792	-0.4944 to 0.4668	0.4728	ns	No	0.0003
Trunk movements	19	0.5102	0.05674 to 0.7891	0.0153	*	Yes	0.2603	18	0.3389	-0.1694 to 0.7048	0.0916	ns	No	0.1149
Global judgments	19	0.3721	-0.1149 to 0.7148	0.0642	ns	No	0.1384	18	0.1726	-0.3360 to 0.6033	0.2539	ns	No	0.0298
Incubation	19	0.4813	0.01848 to 0.7743	0.0216	*	Yes	0.2316	18	0.4268	-0.06791 to 0.7530	0.0438	*	Yes	0.1821
Total points	19	-0.2717	-0.6555 to 0.2236	0.1377	ns	No	0.07382	18	0.171	-0.3375 to 0.6022	0.2558	ns	No	0.0293
Sensory integration	19	-0.2867	-0.6647 to 0.2082	0.1244	ns	No	0.08218	18	0.1605	-0.3470 to 0.5953	0.2692	ns	No	0.0258
Motor coordination	19	-0.2799	-0.6605 to 0.2152	0.1303	ns	No	0.07834	18	-0.05555	-0.5223 to 0.4369	0.4162	ns	No	0.0031
Sequence of motor complex disturbances	19	-0.2715	-0.6554 to 0.2238	0.1379	ns	No	0.07372	18	0.2988	-0.2125 to 0.6816	0.122	ns	No	0.0893
Facial expression	19	-0.2388	-0.6349 to 0.2568	0.17	ns	No	0.05701	18	-0.05923	-0.5250 to 0.4339	0.4107	ns	No	0.0035
Tremor	19	-0.2555	-0.6454 to 0.2402	0.1531	ns	No	0.06526	18	-0.03624	-0.5081 to 0.4524	0.4451	ns	No	0.0013
Akinesia	19	-0.323	-0.6864 to 0.1696	0.0956	ns	No	0.1043	18	-0.1198	-0.5678 to 0.3830	0.3235	ns	No	0.0144
Rigidity	19	-0.3615	-0.7088 to 0.1269	0.0702	ns	No	0.1307	18	-0.3084	-0.6873 to 0.2023	0.1142	ns	No	0.0951
Akathisia	19	-0.1504	-0.5769 to 0.3405	0.2757	ns	No	0.02263	18	-0.419	-0.7489 to 0.07735	0.0471	*	Yes	0.1755
Dystonia	19	-0.2022	-0.6115 to 0.2923	0.2105	ns	No	0.0409	18	-0.344	-0.7077 to 0.1639	0.0882	ns	No	0.1183

Table 4

Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) scores for positive subscore, negative subscore, general subscore, and G4 and G5 values. SZ patients are grouped based on their postmortem neuropathological findings (Table 1). Medical reasons for no clinical information of the following patients follows. Patient 21 was non-collaborative. Patient 23 was not evaluated; he showed orofacial dyskinesia and distal extremity tremor. Patient 28 died before evaluation. Patient 33 was not evaluated; he presented psychomotor slowness. Patient 34 was not evaluated; he showed parkinsonism. Patient 39 was non-collaborative; he showed dyskinesia and distal tremor in upper extremities. Dashed sample IDs showed reduced A_{2A}R levels.

	Sample ID#	p_positive	p_negative	p_general	pansPG4	pansPG5
Group D	19	20	39	60	3	4
	20	19	35	58	4	4
	21	–	–	–	–	–
	22	20	49	80	5	6
	23	–	–	–	–	–
Group E	24	34	38	80	6	7
	25	43	30	77	6	6
	26	28	23	39	2	2
	27	36	27	57	2	2
	28	–	–	–	–	–
Group F	29	18	23	41	4	3
	30	36	33	67	5	5
	31	17	20	41	3	4
	32	25	48	44	1	3
	33	–	–	–	–	–
	34	–	–	–	–	–
	35	12	28	34	1	1
	36	28	28	59	4	5
	37	35	42	65	6	5
	38	43	43	77	7	6
	39	–	–	–	–	–

antipsychotic medication use. It would be interesting to carry out this study on drug-naïve SZ patients although it would hardly be feasible due to the advisability of drug prescription in most of the diagnosed SZ patients. Third, our cohort was made up only of males since the postmortem brain collection of the Brain Bank belongs to a hospital formerly dedicated to the care of male mental patients. Therefore, a clinical trial with a larger cohort with equal representation of both genders, and based on radioimaging, should be considered to reinforce the molecular SZ group proposed herein.

In summary, the present findings allow us to establish a subgroup of SZ patients with reduced striatal A_{2A}R levels and motor disturbances, which may be useful in clinical practice in order to personalize antipsychotic dosage. The use of radioimaging techniques to determine striatal A_{2A}R levels as well as the presence of motor problems (even in drug-naïve SZ patients) may represent a valuable diagnostic tool for prescribing adjunctive therapy based on A_{2A}R agonists or modulators of adenosynergic signalling in conjunction with antipsychotic drugs.

Contributors

MB designed the research. IVM, SDS, M. Blanch and TPV carried out the experiments. AM, LMP and IF provided human samples and compiled the clinical patient data. IVM, JLA and MM undertook statistical analysis. IVM, JLA, MM and MB analyzed data. MB wrote the first draft of the manuscript. JLA and MM contributed to the final manuscript. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Role of the funding source

This work was supported by La Fundació La Marató de TV3 (090330 to M.B. and 092331 to M.M.) and by Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23034) to M.M. I.V.M. is the recipient of an IDIBELL predoctoral fellowship.

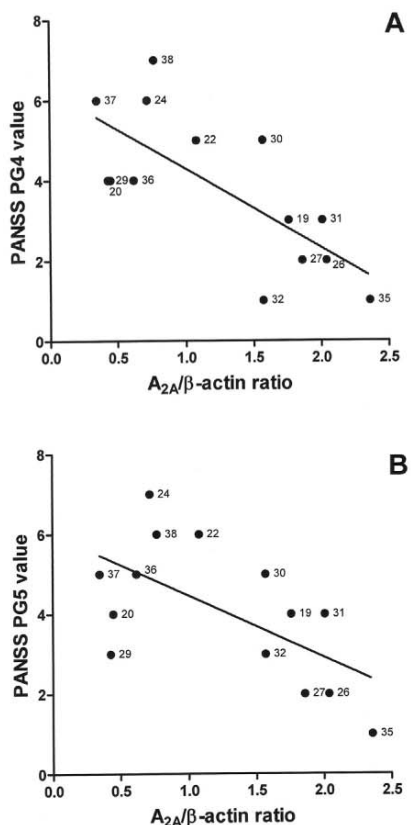


Fig. 5. A negative correlation between A_{2A}R protein levels and PANSS values was found. Pearson r correlation coefficient revealed a strong negative correlation between A_{2A}R protein levels determined by western blot and PANSS G4 and (A) and G5 (B) scores.

Conflict of interest

The manuscript is not under consideration for publication elsewhere and the present form has been approved by all authors. The material is original research. There is no conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. José Manuel Menchón and Dr. Mercedes Roca for clinical discussions, and Dr. Josep Maria Haro for his valuable advice on the writing of this manuscript. We thank T. Yohannan for editorial assistance.

References

Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, Smith CL, Faraone SV, Wilcox M, et al. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 2005;134B:60–6.

Akhondzadeh S, Shasavand E, Jamilian H, Shabestari O, Kamalipour A. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther* 2000;25:131–7.

Akhondzadeh S, Safarcherati A, Amini H. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:253–9.

Albasanz JL, Perez S, Barrachina M, Ferrer I, Martín M. Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2008;18:211–9.

Boison D, Singer P, Shen HY, Feldon J, Yee BK. Adenosine hypothesis of schizophrenia—opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacol* 2012;62:1527–43.

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

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 2006;112:389–404.

Brunstein MG, Ghisolfi ES, Ramos FL, Lara DR. A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2005;66:213–9.

Brunstein MG, Silveira Jr EM, Chaves LS, Machado H, Schenkel O, Belmonte-de-Abreu P, et al. Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenic receiving antipsychotic treatment. *Neurosci Lett* 2007;414:61–4.

Buchanan RW, Heinrichs DW. The Neurological Evaluation Scale (NES): a structured instrument for the assessment of neurological signs in schizophrenia. *Psychiatry Res* 1989;27:335–50.

Buira SP, Dentesano G, Albasanz JL, Moreno J, Martín M, Ferrer I, et al. DNA methylation and Yin Yang-1 repress adenosine A_{2A} receptor levels in human brain. *J Neurochem* 2010a;115:283–95.

Buira SP, Albasanz JL, Dentesano G, Moreno J, Martín M, Ferrer I, et al. DNA methylation regulates adenosine A(2A) receptor cell surface expression levels. *J Neurochem* 2010b;112:1273–85.

Deckert J, Nöthen MM, Bryant SP, Schuffenhauer S, Schofield PR, Spurr NK, et al. Mapping of the human adenosine A_{2A} receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. *Hum Genet* 1997;99:326–8.

Deckert J, Brenner M, Durany N, Zöchling R, Paulus W, Ransmayr G, et al. Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *Neuroreport* 2003;14:313–6.

Dempster EL, Pidsley R, Schalkwyk LC, Owens S, Georgiades A, Kane F, et al. Disease-associated epigenetic changes in monozygotic twins discordant for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet* 2011;20:4786–96.

Dickerson FB, Stallings CR, Origoni AE, Sullens A, Khushalani S, Sandson N, et al. A double-blind trial of adjunctive allopurinol for schizophrenia. *Schizophr Res* 2009;109:66–9.

Dixon DA, Fenix LA, Kim DM, Raffa RB. Indirect modulation of dopamine D₂ receptors as potential pharmacotherapy for schizophrenia: I. Adenosine agonists. *Ann Pharmacother* 1999;33:480–8.

Ferré S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacol Berl* 1997;133:107–20.

Ferrer I, Martinez A, Boluda S, Parchi P, Barrachina M. Brain banks: benefits, limitations and cautions concerning the use of post-mortem brain tissue for molecular studies. *Cell Tissue Bank* 2008;9:181–94.

Ferrer I. Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol* 2012;97:38–51.

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527–52.

Gavin DP, Akbarian S. Epigenetic and post-transcriptional dysregulation of gene expression in schizophrenia and related disease. *Neurobiol Dis* 2012;46:255–62.

Gotoh L, Mitsuyasu H, Kobayashi Y, Oribe N, Takata A, Ninomiya H, et al. Association analysis of adenosine A1 receptor gene (ADORA1) polymorphisms with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatr Genet* 2009;19:328–35.

Grayson DR, Chen Y, Dong E, Kundakovic M, Guidotti A. From trans-methylation to cytosine methylation: evolution of the methylation hypothesis of schizophrenia. *Epigenetics* 2009;4:144–9.

Grayson DR, Guidotti A. The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 2013;38:138–66.

Guidotti A, Dong E, Kundakovic M, Satta R, Grayson DR, Costa E. Characterization of the action of antipsychotic subtypes on valproate-induced chromatin remodeling. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:55–60.

Guy W. Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS). ECDEU assessment manual of psychopharmacology. Rockville: Md: US Department of Health, Education and Welfare Publication (ADM) 76-338; 1976. pp. 534–7. National Institute of Mental Health.

Hohoff C, Mullings EL, Heatherley SV, Freitag CM, Neumann LC, Domschke K, et al. Adenosine A(2A) receptor gene: evidence for association of risk variants with panic disorder and anxious personality. *J Psychiatr Res* 2010;44:930–7.

Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009;35:549–62.

Jenner P, Mori A, Hauser R, Morelli M, Fredholm BB, Chen JF. Adenosine, adenosine A_{2A} antagonists, and Parkinson's disease. *Park Rel Disord* 2009;15:406–13.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012;13:484–92.

Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987;13:261–76.

Kozielska M, Pilla Reddy V, Johnson M, de Ridder F, Vermeulen A, Liu J, et al. Sensitivity of individual items of the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) and items subgroups to differentiate between placebo and drug treatment in schizophrenia. *Schizophr Res* 2013;146:53–8.

Kundakovic M, Chen Y, Costa E, Grayson DR. DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes. *Mol Pharmacol* 2007;71:644–53.

Kurumaji A, Toru M. An increase in [3H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res* 1998;808:320–3.

- Lara DR, Souza DO. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses* 2000;54:157–66.
- Levenson JM. DNA (cytosine-5) methyltransferase inhibitors: a potential therapeutic agent for schizophrenia. *Mol Pharmacol* 2007;71:635–7.
- Mill J, Tang T, Kaminsky Z, Khare T, Yazdanpanah S, Bouchard L, et al. Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis. *Am J Hum Genet* 2008;82:696–711.
- Mishina M, Kimura Y, Naganawa M, Ishii K, Oda K, Sakata M, et al. Differential effects of age on human striatal adenosine A1 and A(2A) receptors. *Synapse* 2012;66:832–9.
- Pappa S, Dazzan P. Spontaneous movement disorders in antipsychotic-naïve patients with first-episode psychoses: a systematic review. *Psychol Med* 2009;39:1065–76.
- Parsons B, Togasaki DM, Kassir S, Przedborski S. Neuroleptics up-regulate adenosine A2a receptors in rat striatum: implications for the mechanism and the treatment of tardive dyskinesia. *J Neurochem* 1995;65:2057–64.
- Peralta V, Cuesta MJ. How many and which are the psychopathological dimensions in schizophrenia? Issues influencing their ascertainment. *Schizophr Res* 2001;49:269–85.
- Peralta V, Campos MS, De Jalón EG, Cuesta MJ. Motor behavior abnormalities in drug-naïve patients with schizophrenia spectrum disorders. *Mov Disord* 2010;25:1068–76.
- Peralta V, Moreno-Izco L, Sanchez-Torres A, García de Jalón E, Campos MS, Cuesta MJ. Characterization of the deficit syndrome in drug-naïve schizophrenia patients: the role of spontaneous movement disorders and neurological soft signs. *Schizophr Bull* 2012 Dec 18. Epub.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 2006;52:139–53.
- Schiffmann SN, Fisone G, Moresco R, Cunha RA, Ferré S. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol* 2007;83:277–92.
- Shen HY, Singer P, Lytle N, Wei CJ, Lan JQ, Williams-Karnesky RL, et al. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest* 2012;122:2567–77.
- Simpson GM, Angus JW. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1970;212:11–9.
- Tochigi M, Iwamoto K, Bundo M, Komori A, Sasaki T, Kato N, et al. Methylation status of the reelin promoter region in the brain of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 2008;63:530–3.
- Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:348–53.
- Villar-Menéndez I, Blanch M, Tyebji S, Pereira-Veiga T, Albasanz JL, Martín M, et al. Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A_{2A}R levels in Huntington's disease. *Neuro-molecular Med* 2013;15:295–309.
- Wonodi I, Gopinath HV, Liu J, Adami H, Hong LE, Allen-Emerson R, et al. Dipyr-idamole monotherapy in schizophrenia: pilot of a novel treatment approach by modulation of purinergic signaling. *Psychopharmacol Berl* 2011;218:341–5.
- Zhang J, Abdallah CG, Wang J, Wan X, Liang C, Jiang L, et al. Upregulation of adenosine A2A receptors induced by atypical antipsychotics and its correlation with sensory gating in schizophrenia patients. *Psychiatry Res* 2012;200:126–32.
- Zhubi A, Veldic M, Puri NV, Kadriu B, Caruncho H, Loza I, et al. An upregulation of DNA-methyltransferase 1 and 3a expressed in telencephalic GABAergic neurons of schizophrenia patients is also detected in peripheral blood lymphocytes. *Schizophr Res* 2009;111:115–22.

IV. ANEXOS:

Participación en otros artículos

A lo largo de esta tesis se ha participado además en los siguientes trabajos:

- **Histone tail acetylation in brain occurs in an unpredictable fashion after death.** Barrachina M, Moreno J, Villar-Menéndez I, Juvés S, Ferrer I.

Cell Tissue Bank. 2012 Dec;13(4):597-606. doi: 10.1007/s10561-011-9278-9. Epub 2011 Sep 16.

- **Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the "adenosine hypothesis".** Aliagas E, Villar-Menéndez I, Sévigny J, Roca M, Romeu M, Ferrer I, Martín-Satué M, Barrachina M.

Purinergic Signal. 2013 Dec;9(4):599-608. doi: 10.1007/s11302-013-9370-7. Epub 2013 Jun 16.

V. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS

Este trabajo ha tratado de caracterizar la implicación de mecanismos epigenéticos en los cambios de expresión del receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R) en las enfermedades de Parkinson (EP), Huntington (EH) y en la esquizofrenia. Para ello se ha trabajado fundamentalmente con muestras humanas de cerebro procedentes de los bancos de tejidos neurológicos de Hospital Universitario de Bellvitge, del Parc Sanitari Sant Joan de Déu y del Hospital Clinic. La región cerebral en la que nos hemos centrado ha sido el putamen, dada la relevancia que los niveles de A_{2A}R en esta área tienen para el control motor y la presencia de síntomas motores en las tres enfermedades estudiadas en este trabajo. El A_{2A}R es capaz de modular la transmisión dopaminérgica mediante la formación de heterodímeros con el receptor de dopamina D₂. En esta situación, la activación del A_{2A}R inhibe el D₂R (Ferre et al., 2008). Por eso sus niveles en patologías donde la transmisión dopaminérgica se ve alterada (como la EP o la esquizofrenia) revisten interés, pues podrían estar implicados en la etiología de la enfermedad o al menos ofrecer una diana para su tratamiento.

Estudios previos del grupo han demostrado cómo la metilación constituye un mecanismo importante de represión transcripcional del gen del A_{2A}R, el *ADORA2A*, que determina en el cerebro su expresión tejido específica (Buirra et al., 2010a; Buirra et al., 2010b). Teniendo en cuenta esta información, se propuso como objeto de esta tesis la comprobación de si este mecanismo epigenético estaba implicado en las alteraciones de la expresión del A_{2A}R estriatal descritas en determinados contextos patológicos. Para cada uno de estos contextos se han comparado muestras humanas de putamen procedentes de individuos afectados por la enfermedad con respecto a sus más apropiados controles, seleccionados atendiendo a criterios de edad, postmortem y comorbilidad.

1. Resultados obtenidos del trabajo realizado relativo a la enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte neuronal en la sustancia negra, tejido que envía aferencias nerviosas dopaminérgicas al estriado. Como consecuencia, los niveles de dopamina que alcanzan el estriado se reducen progresivamente y aparece la sintomatología motora. Esta **hipodopaminergia** se ve además agravada por una sobreexpresión patológica del receptor de adenosina A_{2A}, capaz de inhibir el receptor de dopamina D₂ (figura 1,

página 136). Elevados niveles del A_{2A}R han sido previamente descritos en el putamen postmortem de casos diagnosticados de EP (Calon et al., 2004; Varani et al., 2010). No obstante, no estaba claro si este aumento estaba relacionado con el tratamiento o con la neurodegeneración, o si era independiente de estos factores. El análisis realizado en este trabajo no sólo reproduce el aumento de expresión proteica del receptor en casos sintomáticos de EP (estadios de Braak 3-5),

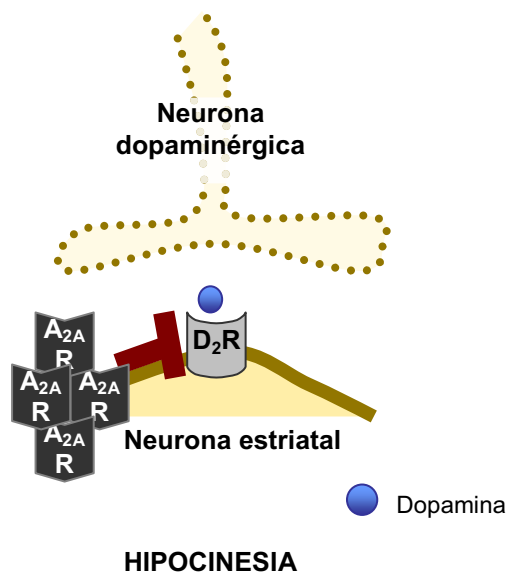


Figura 1. Representación esquemática de la sinapsis nigro-estriatal en la EP.

sino también en tres casos preclínicos, sin síntomas, tratamiento ni muerte neuronal significativa cuyo diagnóstico fue realizado a nivel postmortem (estadios de Braak 1-2).

Este aumento de los niveles de expresión proteica en el putamen se ve acompañado por un aumento en los niveles de ARNm sólo en los casos sintomáticos (estadios 3-5). Esto sugiere que en los casos tempranos (estadios 1-2) la desregulación de la expresión podría ser a nivel postranscripcional, mientras que en los estadios 3-5 la regulación es transcripcional, y la metilación podría estar implicada.

El análisis de los perfiles de metilación de los casos en estadios 3-5 revela una bajada de metilación en dos sitios CpG situados en el promotor del gen *ADORA2A*, que podrían contribuir a la sobreexpresión del receptor en estas etapas.

Los microARNs son pequeños ARN no codificantes que pueden bloquear la traducción de ARNm con los que tienen cierta homología y que tienen como diana. Una reducción de los microARNs hsa-miR-34b y hsa-miR-34c ha sido descrita en determinadas áreas cerebrales de tejido humano postmortem procedente de personas con EP (Miñones-Moyano et al., 2011). Además, varias bases de datos proponen la región 3'UTR de *ADORA2A* como diana para estos microARNs, por lo que se seleccionaron como potenciales implicados en la sobreexpresión patológica del A_{2A}R en esta patología. Los casos analizados con EP muestran niveles menores del microARN hsa-miR-34b, independientemente del estadio.

Para comprobar si efectivamente la disminución de los niveles del hsa-miR-34b podía ser responsable del aumento en la expresión del A_{2A}R, se ha empleado un ensayo funcional mediante

gen reportero en células SH-SY5Y. Este gen reportero, que expresa la luciferasa unida al 3'UTR de *ADORA2A*, es sensible a los cambios en los niveles del hsa-miR-34b. Esta sensibilidad se pierde si mutamos la zona a la que se une el microARN, por lo que se trata de un efecto específico. Además, el *knockeo* del hsa-miRNA-34b en células en cultivo mediante la transfección con un ARN de interferencia específico, emulando lo que sucede en tejido, induce un aumento de la expresión del $A_{2A}R$ endógeno.

Como resultado de este trabajo, consúltese el artículo en revisión.

2. Resultados obtenidos del trabajo realizado relativo a la enfermedad de Huntington

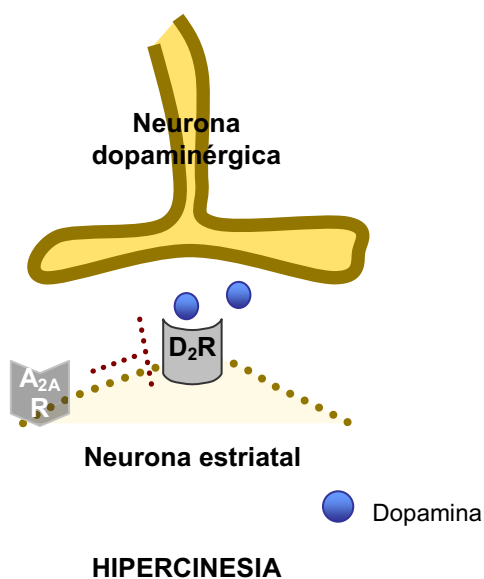


Figura 2. Representación esquemática de la sinapsis nigro-estriatal en la EH.

La EH es una enfermedad genética autosómica dominante que se debe a la expansión de un triplete CAG en el gen de la huntingtina. La principal consecuencia es la degeneración del estriado, lo que deriva en una sintomatología motora característica. En este sentido podría verse también como una situación opuesta a la EP en la que la neurodegeneración afectaba a la sustancia negra. Es decir, tenemos un trastorno hipocinético caracterizado por la pérdida neuronal en el tejido que segrega la dopamina en los ganglios basales (la EP, figura 1, página 136) y un trastorno hiperkinético en el que la muerte neuronal afecta al tejido que recibe esa dopamina (la EH, figura 2).

Aunque no tienen nada que ver, la EH y la esquizofrenia comparten algunos rasgos que nos llevaron a abordar el estudio de muestras de EH de manera similar a como lo hicimos con las de esquizofrenia. En ambas enfermedades hay sintomatología psiquiátrica y motora. Además, en la EH se ha descrito una reducción importante de la expresión proteica del $A_{2A}R$ (Glass et al., 2000) como la que describimos en la mitad de los casos de esquizofrenia.

El análisis de las muestras de EH reproduce el descenso de expresión del A_{2A}R previamente descrito. Esta disminución se produce también a nivel de ARNm, por lo que se estudiaron los contenidos de metilcitosina e hidroximetilcitosina en el promotor de *ADORA2A* de estas muestras con respecto a sus controles más apropiados. En concordancia con la reducción de proteína y ARNm, hay un incremento en los perfiles de metilación del gen y una disminución en el contenido de hidroximetilcitosina. La hidroximetilcitosina es una marca epigenética recientemente descrita que tiene que ver con la reactivación transcripcional (Valinluck et al., 2004). Parece tener un importante papel durante el desarrollo, y ya en fase adulta ha sido descrita preferentemente en el cerebro (Li and Liu, 2011). Este trabajo revela por primera vez su posible participación en un proceso patológico neurodegenerativo.

Como resultado de este trabajo, consúltese el artículo publicado I.

3. Resultados obtenidos del trabajo realizado relativo a la esquizofrenia

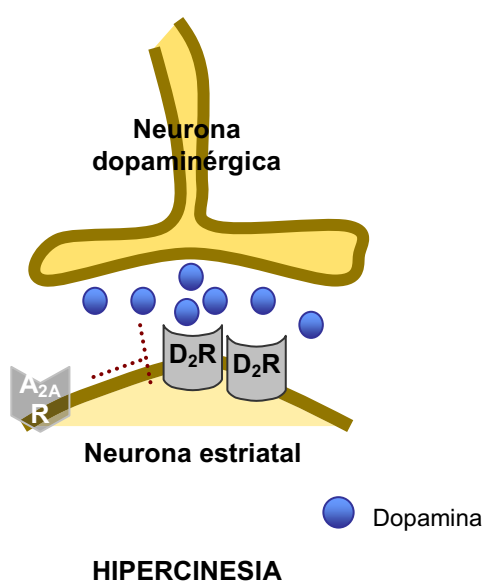


Figura 3. Representación esquemática de la sinapsis nigro-estriatal en el putamen de los casos de esquizofrenia con niveles del A_{2A}R educidos.

Más que de una enfermedad, la esquizofrenia se trata de un síndrome, un conjunto de síntomas cuyas causas en realidad son diversas. Los clínicos acostumbran de hecho a clasificar los pacientes en función de fenotipos basados en los síntomas o las respuestas a los tratamientos. Una de las explicaciones más aceptadas para la etiología de este trastorno es la de una hiperdopaminergia en los ganglios basales. En este sentido, podría verse como una imagen especular de la EP, caracterizada a su vez por hipodopaminergia (figura 3). También ha sido propuesta una hipoglutamatergia en la esquizofrenia. La capacidad de los receptores de adenosina de interactuar con las transmisiones dopaminérgica y glutamatérgica ha llevado a

la propuesta de una hipoadenosinergia como fenómeno causal de las otras dos alteraciones (Boison et al., 2012). Existen trabajos que describen la sobreexpresión del A_{2A}R en el cerebro de personas con esquizofrenia, así como la mayor actividad del D₂R en esos individuos (Deckert et

al., 2003; Howes et al., 2009; Kurumaji and Toru, 1998). Considerando esta información, se han analizado los niveles de A_{2A}R, A₁R y D₂R en las muestras de putamen de personas con esquizofrenia con respecto a sus más apropiados controles.

Contra lo que esperábamos, los niveles del D₂R y el A₁R no muestran alteraciones, mientras que los del A_{2A}R no sólo no están incrementados sino que caen considerablemente en aproximadamente la mitad de las muestras analizadas correspondientes a personas con esquizofrenia. Esta disminución en los niveles de proteína del A_{2A}R en el putamen se ve acompañada por una reducción también en los niveles de ARNm y un incremento en los perfiles de metilación del promotor de *ADORA2A* en las mismas muestras.

Disponemos de los registros de las escalas de evaluación de la esquizofrenia aplicadas a los individuos antes de su muerte. La regresión lineal cruzando los valores de esas escalas con los valores relativos de expresión de A_{2A}R muestra una correlación inversa entre los niveles de expresión del receptor y la incidencia de síntomas motores, independiente del tratamiento recibido. Estos resultados han permitido la propuesta de caracterización de un subgrupo de individuos con esquizofrenia (en línea con los fenotipos con los que trabajan los clínicos) definido por una menor expresión del A_{2A}R debida a hipermetilación y una mayor incidencia de síntomas motores. Este subgrupo de pacientes podría beneficiarse de tratamientos que modulan el sistema adenosinérgico (Akhondzadeh et al., 2005) o de tratamientos metilantes como los inhibidores de la DNA-metil transferasas, propuestos para la esquizofrenia aunque aún en desarrollo (Levenson, 2007). La asignación de los pacientes al subgrupo de bajos niveles de A_{2A}R puede realizarse midiendo los niveles de expresión de la proteína mediante radioimagen o adoptando el trastorno motor como criterio diagnóstico.

Como resultado de este trabajo, consúltese el artículo publicado II.

En conjunto, estos resultados:

- Refuerzan las evidencias en torno a una relación entre la expresión estriatal del A_{2A}R y el control motor.
- Muestran la implicación de mecanismos de regulación epigenética en la alteración de los niveles de expresión del A_{2A}R en el estriado en diferentes contextos neuropatológicos.
- Ofrecen soporte a ciertas estrategias terapéuticas propuestas para estas enfermedades basadas en la modulación de la actividad o de la expresión del A_{2A}R. Indican además un uso po-

tencial para la medida de los niveles del A_{2A}R en los pacientes con trastorno motor. Esta información permitiría una mayor personalización de los tratamientos y una mejora en la interpretación de las respuestas individuales a los fármacos.

VI. DISCUSIÓN

La adenosina juega un importante papel en el SNC como neuromodulador sináptico. Existen cuatro receptores de membrana a través de los cuales puede actuar: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, siendo los más expresados en el cerebro el A₁ y el A_{2A}. El receptor A_{2A} (A_{2A}R) está especialmente enriquecido en el estriado. Este tejido forma parte de los ganglios basales, conjunto de núcleos subcorticales que se encargan, entre otros, de la selección de patrones motores (Gerardin et al., 2004; Lehericy et al., 2004; Mink, 2003). Para entender su funcionamiento, nos hemos apoyado en este trabajo el modelo clásico (Albin et al., 1989; Alexander et al., 1990; Alexander et al., 1986; Blandini et al., 2000; DeLong, 1990), según el cuál el estriado es la estructura de entrada de información: recibe terminales glutamatérgicas procedentes de la corteza y terminales dopaminérgicas de la sustancia negra. Está formado en un 95% por neuronas espinosas medianas GABAérgicas (Kemp, 1968; Kemp and Powell, 1971) que pueden dividirse en dos poblaciones, cada una de las cuales conforma un circuito de señalización: la vía directa, estimuladora de la actividad motora, y la vía indirecta, que inhibe la actividad motora. Del balance entre estos dos circuitos depende la mayor o menor activación de la estructura de salida de los ganglios basales, que inhibe tónicamente el tálamo y está formada por la sustancia negra compacta y el globo pálido medio (SNc/GPm). La actividad de la sustancia negra reticulada, que libera dopamina en el estriado, descompensa la actividad entre las dos vías, activando la directa e inhibiendo la indirecta. Como resultado la actividad del conjunto SNc/GPm se ve inhibida, y la inhibición talámica se relaja. Las neuronas del tálamo se activan, liberando glutamato en la corteza motora. De esta manera se cierra el circuito corteza-ganglios basales-tálamo-corteza y se inicia el movimiento. La dopamina tiene un efecto diferencial sobre las vías estriatales gracias a que las dos poblaciones neuronales difieren en su patrón de expresión proteica.

Las neuronas de la vía indirecta expresan el receptor de dopamina D₂ (D₂R) y encefalina. Son estas células las que concentran elevados niveles del A_{2A}R, que forma heterodímeros con el D₂R inhibiéndolo, antagonizando los efectos de la dopamina. Esto permite a este receptor jugar un papel diferencial en este tejido afectando a la integración de los movimientos voluntarios mediante la modulación de la señal dopaminérgica.

La enfermedad de Parkinson (EP) ofrece un ejemplo paradigmático de trastorno motor asociado a una disfunción de los ganglios basales. La degeneración de la sustancia negra que ocurre en esta patología conduce a una reducción de la señal dopaminérgica en el estriado. Como consecuencia, se desarrolla un trastorno hipocinético. Se ha descrito en la EP una sobreexpresión pa-

tológica del A_{2A}R estriatal que agrava la hipodopaminergia bloqueando el D₂R. Esta sobreexpresión del A_{2A}R correlaciona con la gravedad de la sintomatología motora (Casetta et al., 2013; Varani et al., 2010).

El trabajo realizado en este laboratorio en los últimos años demuestra cómo la metilación es responsable de la expresión basal del A_{2A}R en líneas celulares y de su regulación tejido específica en el cerebro (Buirea et al., 2010a; Buirea et al., 2010b). En la presente tesis se ha tratado de comprobar si éste u otro mecanismo epigenético están implicados en las alteraciones de la expresión del A_{2A}R en distintos contextos neuropatológicos, en concreto la EP, la enfermedad de Huntington (EH) y la esquizofrenia. Para ello se ha trabajado fundamentalmente con muestras humanas de cerebro procedentes de los bancos de tejidos neurológicos del Hospital Universitario de Bellvitge (Hospitalet de Llobregat), del Parc Sanitari Sant Joan de Déu (Sant Boi de Llobregat) y del Hospital Clinic (Barcelona). La región cerebral en la que nos hemos centrado ha sido el putamen, la zona del estriado más estrechamente relacionada con el control motor (Gerardin et al., 2004; Groenewegen, 2003; Lawrence et al., 1998; Lehericy et al., 2004; Mink, 2003; Vink et al., 2005; Yin and Knowlton, 2006). El uso de material humano postmortem obliga a enfrentar problemas importantes, como la conservación de la muestra, la heterogeneidad de los casos o la comorbilidad. Por poner el caso más claro, hasta un 80% de las personas que superan los 65 años presentan marcas diagnósticas de la enfermedad de Alzheimer en el análisis neuropatológico postmortem, hayan o no desarrollado síntomas clínicos (Ferrer, 2012). Para

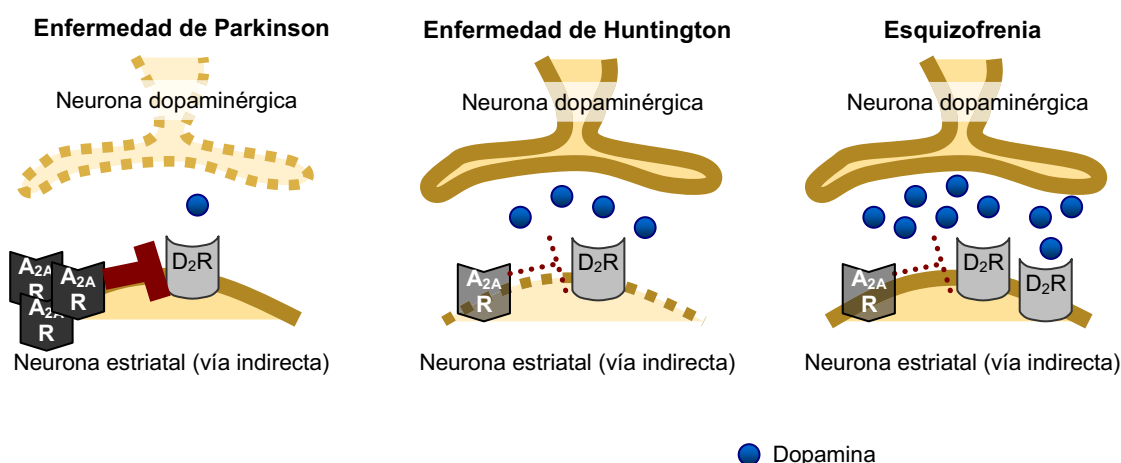


Figura 1. Representación esquemática de la sinapsis nigro-estriatal en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esquizofrenia. La neurodegeneración se representa mediante una membrana celular discontinua y una mayor transparencia del soma. La mayor transparencia de los receptores indica su expresión reducida. El grosor y continuidad de la línea que indica las interacciones entre los receptores indica su intensidad.

evitar la influencia que la aparición de ésta y otras patologías asociadas pudieran tener en los resultados, se consideró este criterio a la hora de elegir los controles de referencia.

Las enfermedades con las que se ha trabajado pueden verse desde un punto de vista teórico como imágenes especulares unas de otras. Tal y como refleja esquemáticamente la figura 1 de la página 144, la EP se caracteriza por una hipodopaminergia en el estriado, mientras que la esquizofrenia ha sido relacionada con una hiperdopaminergia en esa región. Por otro lado, mientras que en la EP hay una pérdida neuronal que afecta al tejido que produce dopamina (la sustancia negra) y trastorno hipocinético, en la EH hay una pérdida neuronal que afecta al tejido que recibe la dopamina y trastorno hipercinético.

1. Potencial traslacional de la manipulación del perfil de metilación del *ADORA2A* en el putamen

El uso de agonistas y antagonistas del receptor tiene limitaciones derivadas de la ubicuidad y multiplicidad de funciones del receptor en el organismo, que conducen a la frecuente aparición de efectos secundarios. Por mencionar un ejemplo, los agonistas del A_{2A}R tienen efecto vasodilatador y antiinflamatorio (Barraco and Phillis, 1991; Spremulli et al., 1983); (Cronstein, 1994). La modulación de los niveles de expresión de un determinado receptor podría constituir una estrategia alternativa a la hora de implementar una terapia cuya diana sea la señalización adenosinérgica. Las sustancias metilantes y desmetilantes del ADN tienen un potencial traslacional como agentes terapéuticos capaces de modular la expresión génica, y por lo tanto la expresión del *ADORA2A*.

Como se ha comentado, el A_{2A}R tiene un perfil de expresión particularmente enriquecido en el estriado en comparación con otras regiones cerebrales. Trabajos previos realizados en este laboratorio han puesto en relación esta elevada expresión tejido específica con el grado de metilación de la región 5'UTR del gen *ADORA2A*. Para ello, se compararon los perfiles de metilación en distintos locus del gen en muestras de ADN extraído a partir de putamen y cerebelo. Como muestra la figura 2 de la página 146, los bajos niveles de expresión basal tanto a nivel de proteína como de ARNm (la figura del ARNm no se muestra) correlacionan en el cerebelo con un perfil de metilación elevado. El estriado, en cambio, muestra unos niveles elevados de expresión del A_{2A}R tanto a nivel de proteína como de ARNm, que se corresponden con un perfil de metilación más bajo. El grado de metilación de muchos de los sitios CpG analizados dobla en el cerebelo el descrito en el putamen.

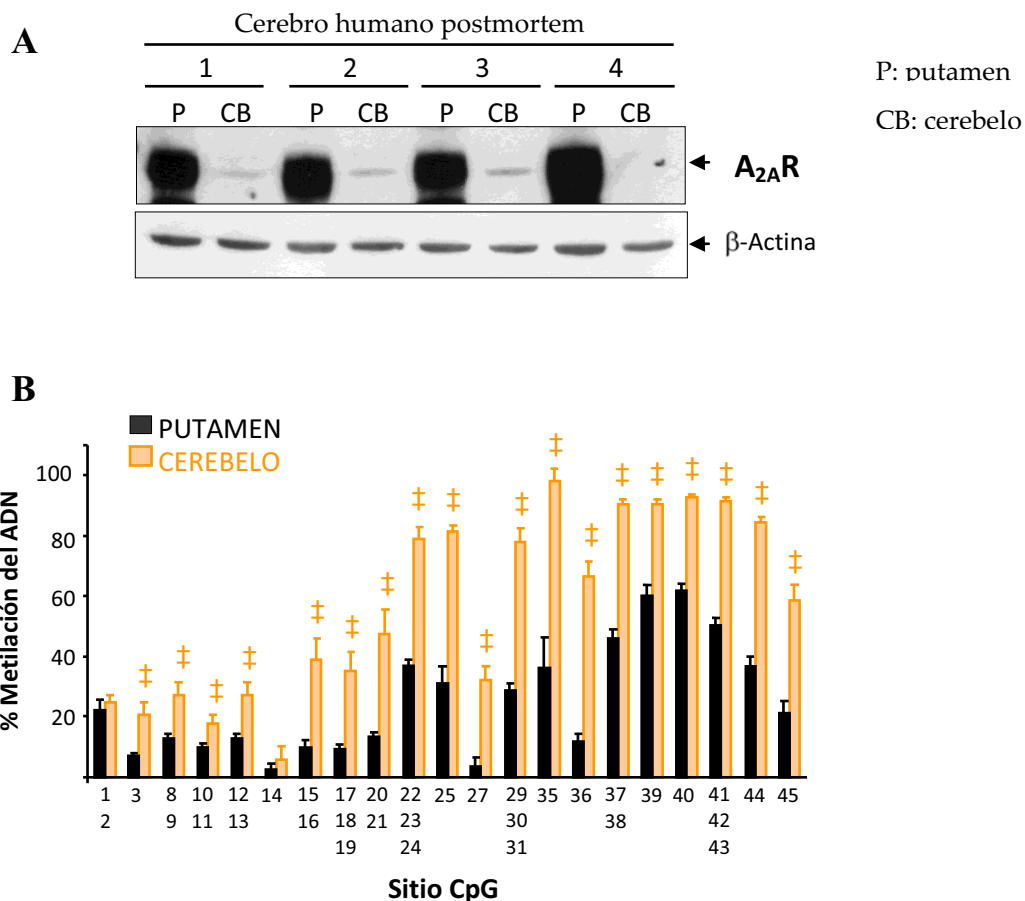


Figura 2. Regulación tejido específica de la expresión del A_{2A}R mediante metilación. A, comparación de los niveles de expresión proteica del receptor mediante western-blot en el tejido postmortem de putamen y cerebello de cuatro individuos. Se observa claramente la expresión tejido específica del A_{2A}R, muy enriquecido en el putamen. B, perfil de metilación de un locus en la región 5'UTR de *ADORA2A* en putamen y cerebello. Hay una relación inversa entre el grado de metilación y la expresión del receptor en los dos tejidos (Buirra et al., 2010a; Buirra et al., 2010b).

Estos trabajos comprobaron además cómo el uso de sustancias metilantes induce cambios en la expresión del receptor sólo en líneas celulares cuyo perfil basal es bajo. El uso de sustancias desmetilantes en líneas celulares sigue un comportamiento similar, induciendo cambios sólo en aquéllas cuyo perfil basal de metilación es elevado. Extrapolando a nivel teórico este resultado puede sugerirse que el patrón de metilación tejido específico del gen del A_{2A}R podría proporcionar una cierta especificidad tisular al efecto de estos fármacos sobre la metilación del *ADORA2A*. A unas determinadas dosis, el SAM no reprimiría la expresión del A_{2A}R más que allí donde es elevada: especialmente en la vía indirecta estriato-pálida (Barrachina et al., 2011). La aplicabilidad de sustancias desmetilantes para aumentar los niveles de expresión del receptor en el estriado sería por el contrario limitada.

Este tipo de fármacos que modulan los perfiles de metilación cuentan con una importante limitación, y es que carecen de especificidad génica. No obstante, la azacitidina (sustancia desmetilante) ha sido aprobada para su uso terapéutico en el tratamiento de ciertos cánceres, mientras que el SAM (sustancia metilante) ha sido empleado en el tratamiento de la depresión sin efectos secundarios (Bottiglieri et al., 1990; Di Rocco et al., 2000; Papakostas, 2009).

2. Efectos de las modificaciones del perfil de metilación sobre la actividad transcripcional

Los cambios en los perfiles de metilación afectan a la unión al ADN de dos tipos de moléculas importantes para la transcripción génica, los factores de transcripción y las proteínas de unión a grupos metilo (MBDs).

Experimentos *in vitro* demuestran que la metilación puede reducir la eficiencia de la unión de un factor de transcripción a su secuencia diana en el ADN (Sunahori et al., 2009; Yossifoff et al., 2008). Esta pérdida de eficiencia se debe, al menos en parte, a que estas zonas ricas en metilcitosina reclutan MBDs independientemente de la secuencia. Trabajos previos realizados en este laboratorio muestran mediante ChIP cómo el tratamiento con SAM en distintas líneas celulares incrementa la presencia de estas proteínas unidas a la región 5'UTR del *ADORA2A*, al tiempo que incrementa la metilación en esa zona y reduce la expresión del gen. El tratamiento con azacitidina, un agente desmetilante, tiene el efecto contrario (Buirra et al., 2010a). La presencia de estas MBDs unidas al ADN conforma una barrera estérica que además recluta otras enzimas implicados en la represión génica, como las HDACs (Portela and Esteller, 2010). El efecto global es un cambio en la conformación de la cromatina que impide el acceso de factores de transcripción y de la maquinaria transcripcional al ADN. No obstante, ha sido descrito un papel dual (tanto represor como activador) al menos para una de estas MBDs, el MeCP₂ (Chahrour et al., 2008). Lamentablemente, la técnica de ChIP es de difícil implementación en tejido postmortem, por lo que la alteración del patrón de unión de las MBDs a la región 5'UTR del *ADORA2A* según el perfil de metilación en las muestras analizadas se mantiene a un nivel teórico (Huang et al., 2006). De momento no disponemos de herramientas que permitan evaluar funcionalmente el impacto de la metilación de un sitio CpG específico, ni la magnitud mínima necesaria de un incremento de metilación para que tenga un impacto en la transcripción.

3. Discusión de los resultados obtenidos en cada contexto patológico

3.1 La enfermedad de Parkinson

La sobreexpresión patológica del A_{2A}R estriatal en la EP y su relación con la gravedad de la sintomatología motora es un hecho previamente descrito (Calon et al., 2004; Casetta et al., 2013; Varani et al., 2010). No obstante, en qué momento se inicia el incremento en los niveles de la proteína, o si el aumento guarda relación con el tratamiento o la muerte neuronal son cuestiones aún por resolver.

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que el aumento de la expresión del A_{2A}R es previo a la sintomatología y al inicio de cualquier tratamiento, aunque no se descarta que los fármacos empleados en el tratamiento de la EP puedan agravarlo. Las etapas iniciales de la enfermedad según Braak son asintomáticas. Hasta el estadio 3 no hay cuerpos de Lewy en la sustancia negra, y la muerte celular no alcanza el 60%. En estas fases tempranas, el aumento de expresión del A_{2A}R afecta a los niveles de proteína pero no a los de ARNm, lo que permite proponer la implicación de un mecanismo de regulación postranscripcional en la sobreexpresión del A_{2A}R. En las etapas sintomáticas (estadios de Braak 3-5), el aumento ocurre tanto a nivel de proteína como de ARNm, lo que sugiere además la participación de un mecanismo de regulación transcripcional.

3.1.1 El papel del microARN hsa-miR-34b en la regulación de la expresión del A_{2A}R en la EP

La reducción de los niveles de los microARNs hsa-miR-34b y hsa-miR-34c ha sido previamente descrita en distintas regiones del cerebro en la EP (Miñones-Moyano et al., 2011). Además, las bases de datos disponibles recogen la posible existencia de dianas de unión para ambos microARNs en la región 3'UTR del ARNm del A_{2A}R, por lo que surgió la cuestión de una posible relación entre sus niveles en el putamen y la sobreexpresión patológica del receptor.

El análisis de los niveles de estos dos microARNs en el putamen de los casos analizados permitió la detección de una reducción en los niveles estriatales del microARN hsa-miR-34b en todos los estadios de Braak, mientras que no se observaron diferencias para el hsa-miR-34c. El A_{2A}R ha sido validado en este trabajo como diana para el hsa-miR-34b mediante ensayos funcionales en células SH-SY5Y. Por lo tanto se sugiere que la reducción en los niveles del microARN detec-

tada en el estriado de los enfermos de EP participa en la sobreexpresión patológica del receptor en todas las etapas de la enfermedad.

3.1.2 El papel de la metilación en la regulación de la expresión del A_{2A}R en la EP

Se analizaron además, en las muestras correspondientes a etapas sintomáticas de la EP, los perfiles de metilación en distintas zonas del promotor del gen *ADORA2A*, con la intención de explicar el aumento de los niveles de ARNm observado en esos casos. Se identificó así una pérdida de metilación en dos sitios CpG en las muestras patológicas al compararlas con las muestras control. Aunque estas dos CpGs no se encuentran en una secuencia predicha como diana para ningún factor de transcripción, la hipometilación puede afectar a la unión de MBDs independientemente de la secuencia en que se localice. Por lo tanto, puede sugerirse en este caso una relación entre la hipometilación y el aumento de expresión del receptor en etapas sintomáticas de la EP.

3.1.3 Potencial traslacional de estos resultados en la EP

El incremento temprano de los niveles del A_{2A}R podría estar relacionado con la menor incidencia de la EP entre consumidores habituales de cafeína, un antagonista del receptor (Palacios et al., 2012). El bloqueo del A_{2A}R permite la recuperación de la funcionalidad del D₂R y aumenta por tanto la sensibilidad de la señalización por dopamina. El uso de antagonistas del A_{2A}R (por ejemplo, la istradefilina) como estrategia terapéutica en la EP está actualmente en fase clínica, con la intención de reducir las dosis empleadas en los tratamientos con levodopa (Bara-Jimenez et al., 2003; Hauser et al., 2008; LeWitt et al., 2008; Mizuno and Kondo, 2013; Stacy et al., 2008). Esta droga, la más ampliamente utilizada en el tratamiento de la EP, provoca a largo plazo el desarrollo de efectos secundarios como las discinesias (Obeso et al., 2000a; Rajput et al., 2002).

El bloqueo del A_{2A}R aumenta la afinidad del D₂R por la dopamina. Esto ha llevado a la realización de ensayos clínicos con istradefilina, como comentábamos. Los perfiles de metilación de tejido específicos descritos para el promotor de *ADORA2A* en el putamen y el cerebelo abren una vía para una estrategia alternativa al bloqueo del A_{2A}R mediante el uso de antagonistas en la EP. Como se comentaba en el apartado 1, el perfil de expresión del A_{2A}R en el cerebro (particularmente enriquecido en el estriado) conferiría una relativa especificidad a un tratamiento con SAM. Esta sustancia sólo induciría metilación del *ADORA2A* sobre aquellas células con un perfil de metilación bajo. En el caso del cerebro, las neuronas GABAérgicas de la vía indirecta. Evidentemente el SAM carece de especificidad y afectaría también a un amplio espectro de genes. No obstante, se trata de una sustancia naturalmente presente en el organismo (es el donador

natural de grupos metilo) que está reducida en los enfermos de EP debido al metabolismo de la levodopa (De Bonis et al., 2010; Muller et al., 2001; Obeid et al., 2007; Zoccolella et al., 2009). Además, el SAM ha sido empleado en el tratamiento de la depresión (muy común, por otro lado, en la EP) sin efectos secundarios (Bottiglieri et al., 1990; Di Rocco et al., 2000; Papakostas, 2009). Aunque son resultados preliminares, se ha participado además en un estudio colaborativo en el que se comprueba que la inyección intraperitoneal de SAM en ratas induce metilación del *ADORA2A* en el estriado, al tiempo que reduce la expresión del A_{2A}R tanto a nivel de proteína como de ARNm en ese tejido (artículo en revisión). En conjunto, estos resultados apoyan la propuesta del potencial uso del SAM como terapia complementaria a la levodopa (Barrachina et al., 2011).

3.2 La enfermedad de Huntington

La EH afecta directamente al estriado, induciendo muerte celular especialmente entre las neuronas GABAérgicas medianas de la vía indirecta. Como consecuencia, se pierde la inhibición motora ejercida por esta vía en condiciones basales (en ausencia de un estímulo dopaminérgico) y se desarrolla el trastorno motor más característico de la enfermedad, la corea de Huntington. Se ha descrito, en la EH, una reducción patológica de los niveles del A_{2A}R (entre otros receptores) cuya causa no reside exclusivamente en la muerte neuronal (Glass et al., 2000; Hodges et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Vonsattel, 2008). La reducción de los niveles del A_{2A}R disminuye el efecto represor que este receptor tiene sobre el D₂R. Como consecuencia, la vía indirecta es más sensible a la señal dopaminérgica. De esta manera esta vía, ya deteriorada de por sí por ser especialmente vulnerable a la citotoxicidad de la huntingtina mutada, muestra hipersensibilidad al efecto depresor que la dopamina tiene sobre ella. La falta de actividad de la vía indirecta puede relacionarse con trastorno hiperkinético, como indican los efectos de los agonistas de los receptores de dopamina o los antagonistas de los receptores de adenosina (ver introducción, apartado 2.1.5)

3.2.1 Mecanismos de represión transcripcional en la EH

La huntingtina mutada (Httm) establece toda una nueva serie de interacciones celulares que tienen un efecto sobre la regulación transcripcional. Estas interacciones implican, entre otros fenómenos, el secuestro de factores de transcripción o la actividad microARN del ARNm de la Httm. Este efecto microARN tiene como diana, entre otros, el ARNm del A_{2A}R. No obstante, ese mecanismo explica sólo un 10% del descenso de los niveles del receptor *in vitro* (Marti et al., 2010). En primer lugar, se procedió al análisis de los niveles de expresión del A_{2A}R en las mues-

tras de que disponíamos. Tanto los niveles de proteína como de ARNm mostraron una reducción al compararlos con los de las muestras control, incluso en una muestra correspondiente a un estadio 0 de Vonsattel. Esto nos llevó a plantear la posible implicación de un mecanismo de regulación transcripcional en el descenso patológico de la expresión del A_{2A}R.

3.2.2 Las modificaciones químicas del ADN participan en la represión transcripcional en la EH

En esta ocasión, además de analizar los perfiles de metilación, se comprobó también el contenido en hidroximetilcitosina del promotor de *ADORA2A*. La hidroximetilcitosina es una marca epigenética recientemente descrita, que aparece especialmente durante el desarrollo y se mantiene en fase adulta sobre todo en el cerebro. Se produce mediante la oxidación por las TETs de las citosinas metiladas. Se cree que constituye un mecanismo de reactivación transcripcional, previo a la desmetilación (Guo et al., 2011). La afinidad de MBDs y DNMTs por la metilcitosina no se mantiene por la hidroximetilcitosina, con lo que su efecto represor se pierde con el proceso de oxidación catalizado por las TETs (Jin et al., 2010; Valinluck et al., 2004).

El tratamiento con bisulfito, técnica tradicionalmente empleada para reconocer las citosinas metiladas en una secuencia de ADN, no distingue entre metilación e hidroximetilación. Debido a esta limitación técnica nos apoyamos en este estudio también en el uso de MeDIPs, inmunoprecipitaciones de ADN en las que empleamos anticuerpos dirigidos específicamente contra metil o hidroximetilcitosina.

El análisis del contenido en metilcitosina con cualquiera de las dos técnicas revela efectivamente un aumento en los cerebros de personas con EH respecto a lo que se observa en los cerebros de personas consideradas como control. Al desglosar el resultado con detalle en los perfiles de metilación, se observa cómo el aumento no es homogéneo, sino que cubre diferentes áreas del promotor según el individuo. Esto concuerda con la idea de la metilación como un proceso dinámico, especialmente en el cerebro, donde ha sido relacionada con plasticidad neuronal y formación de la memoria (Miller et al., 2008).

Por su parte, el análisis del contenido en hidroximetilcitosina muestra una reducción en los casos de EH con respecto a los casos control. Por lo que sabemos, este es el primer trabajo publicado relacionando, en tejido humano postmortem, una alteración en los niveles de esta modificación química y una patología neurodegenerativa.

Un argumento en contra de estos resultados es la posibilidad de que todos ellos, desde el cam-

bio en los niveles de expresión hasta las variaciones de los contenidos en metil e hidroximetilcitosina sean un artefacto resultado de la muerte celular selectiva de las neuronas de la vía indirecta. No obstante, existen trabajos que demuestran que la reducción de la expresión de los receptores no es sólo resultado de la muerte neuronal (Glass et al., 2000; Hodges et al., 2006; Kuhn et al., 2007; Vonsattel, 2008). En cuanto a los perfiles de metilación y el contenido en hidroximetilcitosina, el resultado se ve reforzado por el análisis realizado en paralelo en los modelos murinos R6/1 y R6/2, que no sufren pérdida neuronal pero sí que muestran alteraciones en los patrones de modificación química del ADN. Por otro lado, no se observó relación entre los cambios en los niveles de metil o hidroximetilcitosina y el estadio de la enfermedad.

Las zonas analizadas incluyen sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y CREB, cuya funcionalidad se ve ya limitada por verse secuestrados por la Httm en la EH (Chen-Plotkin et al., 2006; Li et al., 2002; Steffan et al., 2000). El aumento en los perfiles de metilación recluta MBDs y HDACs, que dificultan la unión de los factores de transcripción al ADN (Buirea et al., 2010a; Sunahori et al., 2009; Yossifoff et al., 2008). La hidroximetilcitosina, a la que se ha atribuido la capacidad de reducir el “reclutamiento” de estas proteínas represoras (Jin et al., 2010; Valinluck et al., 2004), presenta niveles reducidos en los casos de EH analizados. De esta manera, el aumento en los niveles de metilcitosina, la reducción de los niveles de hidroximetilcitosina y el secuestro de factores de transcripción por la Httm constituyen mecanismos relacionados que cooperan en la represión transcripcional del *ADORA2A* en la EH.

3.2.3 Potencial traslacional de estos resultados en la EH

La descripción detallada de todos los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones transcripcionales que ocurren en la enfermedad ofrece un mayor número de potenciales dianas terapéuticas. El $A_{2A}R$ ha sido planteado como diana terapéutica en la EH, con la propuesta del uso de antagonistas presinápticos en etapas tempranas y agonistas postsinápticos en etapas avanzadas (ver introducción, apartado 3.2.4). La descripción de una hipermetilación del promotor del receptor en la enfermedad podría abrir paso al uso de DNMTi como tratamiento en estadios avanzados. La efectividad de estas sustancias para modificar los niveles de metilación en neuronas postmitóticas ha sido comprobada *in vivo* (Feng et al., 2010).

La recuperación de los niveles del $A_{2A}R$ no sólo podría contribuir a la funcionalidad de las neuronas de la vía indirecta, las más afectadas por la neurodegeneración, sino que podría favorecer el efecto sobre ellas de factores de crecimiento como el BDNF. La producción y señalización de este factor trófico, promotor de la supervivencia celular, ha sido relacionada con la activación

del A_{2A}R (Tebano et al., 2008).

3.3 La esquizofrenia

La etiología de la esquizofrenia es aún objeto de investigación. Está por definir incluso si el término designa una sola enfermedad o más bien un síndrome, o si se solapa con otros trastornos psiquiátricos similares. Los clínicos acostumbran a trabajar con subgrupos fenotípicos, apuntando a la idea del síndrome (Lang et al., 2007; Takahashi, 2013; Tsuang and Faraone, 1995; van Os, 2009). La clasificación de los pacientes en subgrupos fenotípicos, apuntando a la idea de síndrome, es una práctica clínica habitual.

3.3.1 La teoría de la hipoadenosinergia. El estudio del receptor de adenosina A_{2A} en la esquizofrenia

La teoría más aceptada a la hora de explicar la etiología de la esquizofrenia es la de la hiperdopaminergia. Se ha descrito, en tejido postmortem, cómo los receptores de dopamina están más activos en el caso de las personas diagnosticadas para esquizofrenia (Howes et al., 2009; Howes and Kapur, 2009). También ha sido propuesta una hipofunción del sistema glutamatérgico (Farber, 2003; Farber et al., 1998). La teoría de la hipoadenosinergia, por último tiene el potencial de integrar las dos anteriores (Boison et al., 2012): mientras que la interacción entre los receptores A₁ y A_{2A} en la neurona presináptica controla la liberación de glutamato y dopamina (ver introducción, 1.2.2 y 2.1.4), la interacción de estos mismos receptores con los receptores de dopamina regula la sensibilidad a la señal dopaminérgica en las neuronas estriatales.

La hipoadenosinergia podría tener al menos dos orígenes. Por un lado, la reducción de los niveles de adenosina en el cerebro de las personas con esquizofrenia. Como se mencionó en la introducción, existen varios trabajos que apoyan esta idea (Aliagas et al., 2013; Dutra et al., 2010). Un déficit de adenosina alteraría el equilibrio entre la activación del A₁ y el A_{2A} en favor de la actividad del A₁, provocando una reducción de los niveles de glutamato secretados. Aunque esto disminuiría también la cantidad de dopamina liberada en la sinapsis, provoca por otro lado una hipersensibilidad del receptor de dopamina D₂, ya que el A_{2A}R no llegaría a activarse. La elevada activación del receptor de dopamina D₂ podría ser primaria a una sobreactivación talámica, mediante una reducción de la actividad de la vía indirecta estriato-pálida. Esta falta de inhibición motora ha sido descrito en varios trabajos en pacientes sin tratamiento (Fukumoto-Motoshita et al., 2009; Krebs et al., 2010; Raemaekers et al., 2002).

Por otro lado, la hipoadenosinergia puede estar relacionada con una reducción en los niveles o

en la actividad de los receptores de adenosina, por lo que procedimos a su caracterización en las muestras de las que disponíamos. Dos trabajos previos, también a partir de tejido postmortem, describen una sobreexpresión del A_{2A}R en el cerebro de personas con esquizofrenia (Deckert et al., 2003; Kurumaji and Toru, 1998). En nuestro caso, y contra estos resultados previos, el análisis de las muestras de putamen de personas con esquizofrenia con respecto al de personas empleadas como casos control muestra cómo aproximadamente un 50% de los casos con esquizofrenia muestra una importante reducción de los niveles del A_{2A}R. El A₁R, por el contrario, no presenta cambios significativos de expresión. La disminución de la expresión del A_{2A}R tendría un efecto análogo al de la reducción de los niveles de adenosina. Conduciría a una sobreactivación del D₂R y una pérdida de la actividad de la vía inhibitoria. Además, la disminución de los niveles del A_{2A}R podría estar relacionada con una pérdida de la señalización por BDNF. Ésta, a su vez, podría estar detrás de la reducción del tamaño del estriado descrita en algunos trabajos (Ballmaier et al., 2008).

3.3.2 La hipermetilación está implicada en la reducción de la expresión del A_{2A}R

La disminución de la expresión del A_{2A}R en el subgrupo de pacientes identificado se produce tanto a nivel de proteína como de ARNm, y va acompañada por un aumento en los perfiles de metilación del promotor del *ADORA2A*, el gen del A_{2A}R. En la bibliografía hay ejemplos de cómo los tratamientos inducen cambios en los perfiles epigenéticos (Dong et al., 2008; Kim et al., 2012), pero de tipo hipometilante. En nuestro estudio, la hipermetilación observada en el promotor de *ADORA2A* de aquellos casos con niveles reducidos del A_{2A}R no mostró correlación alguna con el tipo de tratamiento recibido.

La esquizofrenia ha sido relacionada previamente con alteraciones epigenéticas, especialmente considerando la existencia de gemelos monozigóticos discordantes para la patología (Poltorak et al., 1997). Algunos genes cuya expresión se ve alterada en la enfermedad han sido relacionados, como en este caso, con hipermetilación (Akbarian et al., 1995; Guidotti et al., 2000; Guidotti et al., 2007; Impagnatiello et al., 1998; Kundakovic et al., 2009; Noh et al., 2005). Las DNMTs están sobreexpresadas en varias regiones cerebrales de personas con esquizofrenia, pudiendo ser responsables de la represión de algunos genes en la enfermedad (Veldic et al., 2005; Veldic et al., 2007). El gen *ADORA2A* está en la región 22q11.2, considerada de riesgo para la esquizofrenia (Arguello and Gogos, 2006; Karayiorgou et al., 1995; Murphy, 2005; Rees et al., 2014; Takahashi et al., 2003). También en esa región está el gen de la COMT (Catecol-o-amino transferasa), enzima hipoactivo en esta enfermedad (Schiffmann et al., 2007). La COMT consume SAM, por lo que su actividad reducida podría estar relacionada con estos fenómenos de hipermetila-

ción en algunos pacientes. Tanto los antipsicóticos de primera como de segunda generación se muestran ineficaces con los síntomas cognitivos y producen efectos secundarios indeseados, por lo que se mantiene el esfuerzo en la búsqueda de tratamientos alternativos para la esquizofrenia (Hasan et al., 2013). Algunos tratamientos basados en la manipulación de la epigenética están hoy en fase clínica, como el ácido valproico (Sharma et al., 2006), un inhibidor de las HDAC que promueve desmetilación recuperando la expresión de algunos genes (Guidotti et al., 2011). El resultado de este trabajo apoyaría la validez de estas estrategias.

3.3.3 La clasificación de los pacientes en subgrupos siguiendo como criterio una alteración motora

La definición de un subgrupo de personas con esquizofrenia caracterizado por unos niveles reducidos del A_{2A}R estriatal y unos mayores índices de alteración motora refuerza la idea de que la esquizofrenia no es una enfermedad simple sino más bien un síndrome. Las alteraciones motoras constituyen un síntoma habitual entre las personas con esquizofrenia que cuenta con ítems propios para su valoración en las escalas de evaluación empleadas en el ámbito clínico. Estas alteraciones pueden ser secundarias, debidas al tratamiento antipsicótico. No obstante, existen evidencias de que los síntomas hiper e hipocinéticos aparecen antes de cualquier tipo de medicación (Pappa and Dazzan, 2009; Peralta et al., 2010). Por otro lado, el uso de la actividad motora como criterio de clasificación de los pacientes relacionado con la prognosis está siendo estudiado en el tratamiento de los delirios (Meagher et al., 2012). En la esquizofrenia, se ha propuesto la inclusión de los síntomas motores entre los criterios fundamentales de diagnóstico y su uso como marcador de la severidad de la enfermedad (Peralta et al., 2010; van Harten and Tenback, 2009). Al menos otro trabajo propone el reconocimiento de un subgrupo de pacientes de esquizofrenia basándose en rasgos fenotípicos que incluyen excitación (Takahashi, 2013), rasgo que podría relacionarse con una hipercinesia como la registrada en nuestro trabajo. Alteraciones motoras de tipo hipercinético (atetoides¹) en la infancia han sido relacionadas con un mayor riesgo de sufrir la enfermedad, y su manifestación en individuos con esquizofrenia se ha propuesto como un rebrote de los mismos síntomas (Neumann et al., 1995; Walker, 1994).

En nuestro trabajo se describe una correlación inversa entre los niveles de expresión del A_{2A}R y las alteraciones de la actividad motora registradas por los ítems PG4 y PG5 de la escala PANSS. Estos valores podrían emplearse para la clasificación de los pacientes en dos subgrupos: pacientes con niveles normales y pacientes con niveles reducidos del A_{2A}R. El PG4 y PG5 registran

¹ Movimientos atetoides: movimientos involuntarios, lentos y sinuosos, que afectan especialmente a las extremidades.

“tensión motora” y “manierismos y posturas”, respectivamente. Este tipo de alteraciones motoras se han visto excluidas del concepto tradicional de trastorno motor por considerarlas psicogénicas, sin una base somática (Fahn et al., 2009), secundarias a un estado de ansiedad o a un delirio, por ejemplo. No obstante, su asociación con un rasgo molecular puede estar revelando esa base somática. Ya se ha desarrollado en la introducción cómo la actividad del A_{2A}R se relaciona con el control motor. El consumo de antagonistas de los receptores de adenosina como el café, totalmente desaconsejado en las personas con esquizofrenia, estimula la locomoción y la ansiedad (El Yacoubi et al., 2000).

3.3.4 Potencial traslacional de estos resultados en la esquizofrenia

La clasificación de los pacientes en estos dos grupos (con niveles normales o reducidos del receptor) puede hacerse mediante técnicas de radioimagen o adoptando el trastorno motor como rasgo diagnóstico. Aunque los antipsicóticos inducen alteraciones motoras, los valores de las escalas de evaluación motora de los casos analizados correlacionan con los niveles del A_{2A}R y no con los tratamientos recibidos por cada paciente. Además, los ítems de la escala PANSS que han mostrado esa relación parecen ser resistentes, al menos, a algunos tratamientos (Kozielska et al., 2013). Saber a qué grupo pertenece cada paciente permitiría el diseño de una terapia personalizada si se decide enfocar el sistema adenosinérgico como diana. Si los niveles reducidos del A_{2A}R juegan un papel en la etiología de la enfermedad, el tratamiento con agonistas de ese receptor sería una posible estrategia terapéutica complementaria al uso de antipsicóticos, ya que rescatando la actividad del A_{2A}R se ejerce un efecto inhibitorio sobre la transmisión dopaminérgica. La medida de los niveles del receptor proporcionaría una valiosa información para la interpretación de los resultados obtenidos en ensayos clínicos que ya se han llevado a cabo modulando los niveles de adenosina en el cerebro mediante el uso de alopurinol o dipiramidol (Akhondzadeh et al., 2005; Akhondzadeh et al., 2000; Brunstein et al., 2005; Lara et al., 2001; Salimi et al., 2008). ¿Obtuvieron mayor beneficio de esta terapia los pacientes con niveles reducidos del receptor? ¿O se mostraron resistentes a esta estrategia, por tener niveles reducidos del A_{2A}R?

VII. CONCLUSIONES

En la enfermedad de Parkinson

1. el aumento de A_{2A}R en el putamen ocurre desde los primeros estadios de Braak (estadios 1 y 2), previamente a la aparición de la sintomatología motora empleada en el diagnóstico de la enfermedad.
2. el hsa-miR-34b regula los niveles de expresión del A_{2A}R al menos *in vitro*, gracias a la existencia de una secuencia en la región 3'UTR del gen *ADORA2A* que constituye una diana de unión para este microARN.
3. el aumento de A_{2A}R en el putamen de personas con EP coincide con una reducción del miR-34b en esta misma región.

En la enfermedad de Huntington

4. la hipermetilación participa como mecanismo de represión transcripcional del A_{2A}R en el putamen en las personas con EH.
5. la pérdida de hidroximetilcitosina participa como mecanismo de represión transcripcional del A_{2A}R en el putamen en las personas con EH.

En la esquizofrenia

6. existe un subgrupo de pacientes con esquizofrenia que presenta unos niveles del A_{2A}R reducidos en el putamen.
7. la reducción del A_{2A}R estriatal en los pacientes es debida a la hipermetilación en la región 5'UTR de su gen, el *ADORA2A*.
8. la reducción del A_{2A}R en el subgrupo está relacionada con un trastorno hiperkinético. Este trastorno puede usarse como criterio diagnóstico para clasificar a los pacientes en dos subgrupos, uno con niveles reducidos del receptor y otro con niveles normales.

VIII. AGRADECIMIENTOS

No estaría escribiendo esto si no fuera por la dirección y la ayuda de la Dra. Marta Barrachina. Pese a un primer encuentro que siempre nos hará reír, depositó siempre mucha más confianza en mí que yo misma. Ha estado ahí siempre que lo he necesitado, y me ha enseñado con paciencia, entre otras muchas cosas, que la tostada no cae siempre del lado de la mermelada. Quiero mencionar aquí además al Dr. Isidro Ferrer, a quien debo agradecer su ayuda y su crítica constructiva, además de su cercanía y más de un reencuentro con la ciencia.

Parte de este trabajo se ha realizado en colaboración con gente de otros grupos, a quienes también quiero expresar mi gratitud. Ha sido un placer coincidir personalmente con los doctores Mairena Martín y José Luís Albasanz de la Universidad de Castilla-La Mancha; la Dra. Mireia Martín y Elisabeth Aliagas de la UB; y Fabiana Núñez, también de la UB. Me gustaría resaltar especialmente a Mireia, que desde el principio apostó por mí y me ha ayudado siempre, sin ni siquiera pedírselo. Ella y toda la gente de su laboratorio me brindaron una acogida estupenda que me animó a plantearme el doctorado como una posibilidad real.

En cuanto a la vida en el laboratorio, Marta Blanch y Thais Pereira han sido dos compañeras de lujo, siempre dispuestas a ayudar en lo que fuera necesario. Han trabajado tanto en esta tesis como yo misma, recordándome por el camino la importancia de disfrutar lo que haces. Los XAC (no, no son un grupo de rock) han sido auténticos soplos de aire fresco y alegría: Xavi, que me hizo ver que la ciencia es compatible con la vida; Cristina, que ha llegado a entenderme sin palabras hasta extremos insospechados; y Aitana, que pese a no estar allí para hacer amigos, me hizo un hueco entre los suyos haciendo de Barcelona una ciudad mucho menos gris. También lo fue Paola, la mujer tranquila que resultó que se apunta a todo.

En realidad hay mucha gente con la que he coincidido estos años en el laboratorio que me ha hecho la tesis más llevadera con cada sonrisa que hemos compartido. Auténticos terremotos de energía y buen humor, como Silvia, Beatrice o Gema. Y aunque he pasado menos tiempo con ellos, todos los compañeros del 4141 y del INP: Marga, Irene, Esther, Mercedes, Nuria, Jesús, Rosi, Loli, Susana...

Y por supuesto, por su apoyo, su amor, su incondicionalidad, su entusiasmo... esta es la parte que dedico a aquellos que me hacen sentir querida, que estando lejos de casi todos es algo sin lo que no podría sobrevivir. Espero aportarles mucho más de lo que pueden significar las cuatro palabras que les puedo dedicar aquí, pero allá van. A mi familia, que me acepta y me valora tal y como soy. Especialmente a mis padres, que creen en mí haga lo que haga, y a mi abuela, a la que me gustaría dedicar mucho más tiempo del que este deambular de vida que llevo me permite. A Hugo, que me ha acompañado todo este tiempo y siempre ha sabido sacar al Dr. Jeckyll del más terrible Mr. Hyde. Y a mis amigos, infalibles a la hora de hacerme sentir viva. Ojalá sepan cuánto los quiero.

¡Aturuxos, gaita y tambor! ¡Pienso celebrar esta tesis con todos vosotros!

Gracias

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Akbarian, S., Kim, J. J., Potkin, S. G., Hagman, J. O., Tafazzoli, A., Bunney, W. E., Jr., Jones, E. G., 1995. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*. 52, 258-66.
- Akhondzadeh, S., Safarcherati, A., Amini, H., 2005. Beneficial antipsychotic effects of allopurinol as add-on therapy for schizophrenia: a double blind, randomized and placebo controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 253-9.
- Akhondzadeh, S., Shasavand, E., Jamilian, H., Shabestari, O., Kamalipour, A., 2000. Dipyridamole in the treatment of schizophrenia: adenosine-dopamine receptor interactions. *J Clin Pharm Ther*. 25, 131-7.
- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B., 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 12, 366-75.
- Alexander, G. E., Crutcher, M. D., DeLong, M. R., 1990. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res*. 85, 119-46.
- Alexander, G. E., DeLong, M. R., Strick, P. L., 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. 9, 357-81.
- Aliagas, E., Villar-Menendez, I., Sevigny, J., Roca, M., Romeu, M., Ferrer, I., Martin-Satue, M., Barrachina, M., 2013. Reduced striatal ecto-nucleotidase activity in schizophrenia patients supports the "adenosine hypothesis". *Purinergic Signal*. 9, 599-608.
- Allen, A. J., Griss, M. E., Folley, B. S., Hawkins, K. A., Pearlson, G. D., 2009. Endophenotypes in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res*. 109, 24-37.
- Anderson, A. N., Roncaroli, F., Hodges, A., Deprez, M., Turkheimer, F. E., 2008. Chromosomal profiles of gene expression in Huntington's disease. *Brain*. 131, 381-8.
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., et al., 1993. The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*. 4, 398-403.
- Arguello, P. A., Gogos, J. A., 2006. Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron*. 52, 179-96.
- Assaife-Lopes, N., Sousa, V. C., Pereira, D. B., Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M., 2013. Regulation of TrkB receptor translocation to lipid rafts by adenosine A receptors and its functional implications for BDNF-induced regulation of synaptic plasticity. *Purinergic Signal*.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Iwatsubo, T., 1998. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*. 152, 879-84.
- 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 Arch*. 447, 735-43.
- Ballestar, E., Wolffe, A. P., 2001. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem*. 268, 1-6.
- Ballmaier, M., Schlagenhaut, F., Toga, A. W., Gallinat, J., Koslowski, M., Zoli, M., Hojatkashani, C., Narr, K. L., Heinz, A., 2008. Regional patterns and clinical correlates of basal ganglia morphology in non-medicated schizophrenia. *Schizophr Res*. 106, 140-7.
- Band, G. P., van Boxtel, G. J., 1999. Inhibitory motor control in stop paradigms: review and reinterpretation of neural mechanisms. *Acta Psychol (Amst)*. 101, 179-211.
- Banez-Coronel, M., Porta, S., Kagerbauer, B., Mateu-Huertas, E., Pantano, L., Ferrer, I., Guzman, M., Estivill, X., Marti, E., 2012. A pathogenic mechanism in Huntington's disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genet*. 8, e1002481.

- Bara-Jimenez, W., Sherzai, A., Dimitrova, T., Favit, A., Bibbiani, F., Gillespie, M., Morris, M. J., Mouradian, M. M., Chase, T. N., 2003. Adenosine A(2A) receptor antagonist treatment of Parkinson's disease. *Neurology*. 61, 293-6.
- Barraco, R. A., Clough-Helfman, C., Goodwin, B. P., Anderson, G. F., 1995. Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J Neurochem*. 65, 1604-11.
- Barraco, R. A., Phillis, J. W., 1991. Subtypes of adenosine receptors in the brainstem mediate opposite blood pressure responses. *Neuropharmacology*. 30, 403-7.
- 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, 276-84.
- Barrachina, M., Ferrer, I., 2009. DNA methylation of Alzheimer disease and tauopathy-related genes in postmortem brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 68, 880-91.
- Barrachina M, Martín M., Ciruela F and Ferrer I, 2011. Epigenetic Modulation of Adenosine A2A Receptor: A Putative Therapeutical Tool for the Treatment of Parkinson's Disease. In Finkelstein (Ed.) *Towards New Therapies for Parkinson's Disease*. InTech, pp 295-312. ISBN: 978-953-307-463-4. doi: 10.5772/16697.
- Barrachina, M., Moreno, J., Villar-Menendez, I., Juves, S., Ferrer, I., 2012. Histone tail acetylation in brain occurs in an unpredictable fashion after death. *Cell Tissue Bank*. 13, 597-606.
- Beal, M. F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2, 325-34.
- Bence, N. F., Sampat, R. M., Kopito, R. R., 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*. 292, 1552-5.
- Benn, C. L., Sun, T., Sadri-Vakili, G., McFarland, K. N., DiRocco, D. P., Yohrling, G. J., Clark, T. W., Bouzou, B., Cha, J. H., 2008. Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *J Neurosci*. 28, 10720-33.
- Bennett, E. J., Shaler, T. A., Woodman, B., Ryu, K. Y., Zaitseva, T. S., Becker, C. H., Bates, G. P., Schulman, H., Kopito, R. R., 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature*. 448, 704-8.
- Beveridge, N. J., Cairns, M. J., 2012. MicroRNA dysregulation in schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 46, 263-71.
- Bilen, J., Liu, N., Burnett, B. G., Pittman, R. N., Bonini, N. M., 2006. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell*. 24, 157-63.
- Birnstiel, S., Gerber, U., Greene, R. W., 1992. Adenosine-mediated synaptic inhibition: partial blockade by barium does not prevent anti-epileptiform activity. *Synapse*. 11, 191-6.
- Black, M. D., Varty, G. B., Arad, M., Barak, S., De Levie, A., Boulay, D., Pichat, P., Griebel, G., Weiner, I., 2009. Procognitive and antipsychotic efficacy of glycine transport 1 inhibitors (GlyT1) in acute and neurodevelopmental models of schizophrenia: latent inhibition studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 202, 385-96.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E., 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 62, 63-88.
- Blum, D., Galas, M. C., Pintor, A., Brouillet, E., Ledent, C., Muller, C. E., Bantubungi, K., Galluzzo, M., Gall, D., Cuvelier, L., Rolland, A. S., Popoli, P., Schiffmann, S. N., 2003a. A dual role of adenosine A2A receptors in 3-nitropropionic acid-induced striatal lesions: implications for the neuroprotective potential of A2A antagonists. *J Neurosci*. 23, 5361-9.
- Blum, D., Hourez, R., Galas, M. C., Popoli, P., Schiffmann, S. N., 2003b. Adenosine receptors and Huntington's disease: implications for pathogenesis and therapeutics. *Lancet Neurol*. 2, 366-74.
- Bogenpohl, J. W., Ritter, S. L., Hall, R. A., Smith, Y., 2012. Adenosine A2A receptor in the monkey basal ganglia: ultrastructural localization and colocalization with the metabotropic glutamate receptor 5 in the striatum. *J Comp Neurol*. 520, 570-89.

- Boison, D., Singer, P., Shen, H. Y., Feldon, J., Yee, B. K., 2012. Adenosine hypothesis of schizophrenia--opportunities for pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 62, 1527-43.
- Boissier, J. R., Simon, P., 1965. [Action of caffeine on the spontaneous motility of the mouse]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 158, 212-21.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J. W., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., Heutink, P., 2003. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*. 299, 256-9.
- Borowiec, A., Lechward, K., Tkacz-Stachowska, K., Skladanowski, A. C., 2006. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim Pol*. 53, 269-78.
- Bottiglieri, T., Godfrey, P., Flynn, T., Carney, M. W., Toone, B. K., Reynolds, E. H., 1990. Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral S-adenosylmethionine. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 53, 1096-8.
- Braak, H., Braak, E., 2000. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol*. 247 Suppl 2, II3-10.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 24, 197-211.
- Brand, F., Klutz, A. M., Jacobson, K. A., Fredholm, B. B., Schulte, G., 2008. Adenosine A(2A) receptor dynamics studied with the novel fluorescent agonist Alexa488-APEC. *Eur J Pharmacol*. 590, 36-42.
- Brundege, J. M., Diao, L., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., 1997. The role of cyclic AMP as a precursor of extracellular adenosine in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 36, 1201-10.
- Brunstein, M. G., Ghisolfi, E. S., Ramos, F. L., Lara, D. R., 2005. A clinical trial of adjuvant allopurinol therapy for moderately refractory schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 66, 213-9.
- Buira, S. P., Albasanz, J. L., Dentesano, G., Moreno, J., Martin, M., Ferrer, I., Barrachina, M., 2010a. DNA methylation regulates adenosine A(2A) receptor cell surface expression levels. *J Neurochem*. 112, 1273-85.
- Buira, S. P., Dentesano, G., Albasanz, J. L., Moreno, J., Martin, M., Ferrer, I., Barrachina, M., 2010b. DNA methylation and Yin Yang-1 repress adenosine A2A receptor levels in human brain. *J Neurochem*. 115, 283-95.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., Smythe, A., 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 40, 668-88.
- Burton, E. A., Glorioso, J. C., Fink, D. J., 2003. Gene therapy progress and prospects: Parkinson's disease. *Gene Ther*. 10, 1721-7.
- Cabello, N., Gandia, J., Bertarelli, D. C., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Lujan, R., Ciruela, F., 2009. Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells. *J Neurochem*. 109, 1497-507.
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., McIlwain, K. L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C. E., Paylor, R., Lu, B., Nussbaum, R. L., 2002. Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*. 22, 8797-807.
- 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*. 127, 1075-84.
- Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casado, V., Canela, E. I., Lluís, C., Goldberg, S. R., Moratalla, R.,

- Franco, R., Ferre, S., 2007. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*. 32, 2249-59.
- Casetta, I., Vincenzi, F., Bencivelli, D., Corciulo, C., Gentile, M., Granieri, E., Borea, P. A., Varani, K., 2013. A adenosine receptors and Parkinson's disease severity. *Acta Neurol Scand*.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., Sipione, S., 2001. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci*. 24, 182-8.
- Ciechanover, A., 1993. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway. *Brain Pathol*. 3, 67-75.
- Ciruela, F., Casado, V., Rodrigues, R. J., Lujan, R., Burgueno, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S. R., Mallol, J., Cortes, A., Canela, E. I., Lopez-Gimenez, J. F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R. A., Ferre, S., Franco, R., 2006. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci*. 26, 2080-7.
- Coney, A. M., Marshall, J. M., 1998. Role of adenosine and its receptors in the vasodilatation induced in the cerebral cortex of the rat by systemic hypoxia. *J Physiol*. 509 (Pt 2), 507-18.
- 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, 2591-5.
- Cronstein, B. N., 1994. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* (1985). 76, 5-13.
- Cunha, R. A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*. 38, 107-25.
- Chahrouh, M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T., Qin, J., Zoghbi, H. Y., 2008. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*. 320, 1224-9.
- Chan, A. Y., Baum, L., Tang, N. L., Lau, C. Y., Ng, P. W., Hui, K. F., Mizuno, Y., Kwan, J. Y., Mok, V. C., Kuo, S. H., 2013. The role of the Ala746Thr variant in the ATP13A2 gene among Chinese patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*. 20, 761-2.
- Charvin, D., Vanhoutte, P., Pages, C., Borrelli, E., Caboche, J., 2005. Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D2 receptor stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 12218-23.
- Chen-Plotkin, A. S., Sadri-Vakili, G., Yohrling, G. J., Braveman, M. W., Benn, C. L., Glajch, K. E., DiRocco, D. P., Farrell, L. A., Krainc, D., Gines, S., MacDonald, M. E., Cha, J. H., 2006. Decreased association of the transcription factor Sp1 with genes downregulated in Huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 22, 233-41.
- Chen, J. F., Eltzhig, H. K., Fredholm, B. B., 2013. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov*. 12, 265-86.
- Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S., Schwarzschild, M. A., 1999. A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci*. 19, 9192-200.
- Chen, S., Lu, F. F., Seeman, P., Liu, F., 2012. Quantitative proteomic analysis of human substantia nigra in Alzheimer's disease, Huntington's disease and Multiple sclerosis. *Neurochem Res*. 37, 2805-13.
- Chen, Y., Sharma, R. P., Costa, R. H., Costa, E., Grayson, D. R., 2002. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res*. 30, 2930-9.
- Cheng, H., Gomes-Trolin, C., Aquilonius, S. M., Steinberg, A., Lofberg, C., Ekblom, J., Oreland, L., 1997. Levels of L-methionine S-adenosyltransferase activity in erythrocytes and

- concentrations of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in whole blood of patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 145, 580-5.
- Chiang, M. C., Chen, H. M., Lai, H. L., Chen, H. W., Chou, S. Y., Chen, C. M., Tsai, F. J., Chern, Y., 2009. The A2A adenosine receptor rescues the urea cycle deficiency of Huntington's disease by enhancing the activity of the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet.* 18, 2929-42.
- 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. *J Biol Chem.* 280, 14331-40.
- Choi, D. W., 1992. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 23, 1261-76.
- Choo, Y. S., Johnson, G. V., MacDonald, M., Detloff, P. J., Lesort, M., 2004. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Hum Mol Genet.* 13, 1407-20.
- Chou, S. Y., Lee, Y. C., Chen, H. M., Chiang, M. C., Lai, H. L., Chang, H. H., Wu, Y. C., Sun, C. N., Chien, C. L., Lin, Y. S., Wang, S. C., Tung, Y. Y., Chang, C., Chern, Y., 2005. CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model. *J Neurochem.* 93, 310-20.
- Chung, K. K., Zhang, Y., Lim, K. L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C. A., Dawson, V. L., Dawson, T. M., 2001. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med.* 7, 1144-50.
- Daval, J. L., Nicolas, F., 1994. Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons. *Neurosci Lett.* 175, 114-6.
- De Bonis, M. L., Tessitore, A., Pellecchia, M. T., Longo, K., Salvatore, A., Russo, A., Ingrassia, D., Zappia, V., Barone, P., Galletti, P., Tedeschi, G., 2010. Impaired transmethylation potential in Parkinson's disease patients treated with L-Dopa. *Neurosci Lett.* 468, 287-91.
- de la Monte, S. M., Vonsattel, J. P., Richardson, E. P., Jr., 1988. Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 47, 516-25.
- de Lau, L. M., Breteler, M. M., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5, 525-35.
- Deckert, J., Brenner, M., Durany, N., Zochling, R., Paulus, W., Ransmayr, G., Tatschner, T., Danielczyk, W., Jellinger, K., Riederer, P., 2003. Up-regulation of striatal adenosine A(2A) receptors in schizophrenia. *Neuroreport.* 14, 313-6.
- DeLong, M. R., 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci.* 13, 281-5.
- Desplats, P., Spencer, B., Coffee, E., Patel, P., Michael, S., Patrick, C., Adame, A., Rockenstein, E., Masliah, E., 2011. Alpha-synuclein sequesters Dnmt1 from the nucleus: a novel mechanism for epigenetic alterations in Lewy body diseases. *J Biol Chem.* 286, 9031-7.
- Dexter, D. T., Sian, J., Rose, S., Hindmarsh, J. G., Mann, V. M., Cooper, J. M., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Schapira, A. H., et al., 1994. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol.* 35, 38-44.
- Dhaenens, C. M., Burnouf, S., Simonin, C., Van Brussel, E., Duhamel, A., Defebvre, L., Duru, C., Vuillaume, I., Cazeneuve, C., Charles, P., Maison, P., Debruxelles, S., Verny, C., Gervais, H., Azulay, J. P., Tranchant, C., Bachoud-Levi, A. C., Durr, A., Buee, L., Krystkowiak, P., Sablonniere, B., Blum, D., 2009. A genetic variation in the ADORA2A gene modifies age at onset in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 35, 474-6.
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., Szczerbinska, A., Zhao, T., Dubbel-Hulsman, L. O., Wouters, C. H., de Graaff, E., Oyen,

- W. J., Simons, E. J., Breedveld, G. J., Oostra, B. A., Horstink, M. W., Bonifati, V., 2009. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*. 72, 240-5.
- Di Rocco, A., Rogers, J. D., Brown, R., Werner, P., Bottiglieri, T., 2000. S-Adenosyl-Methionine improves depression in patients with Parkinson's disease in an open-label clinical trial. *Mov Disord*. 15, 1225-9.
- Dickenson, J. M., Hill, S. J., 1998. Involvement of G-protein betagamma subunits in coupling the adenosine A1 receptor to phospholipase C in transfected CHO cells. *Eur J Pharmacol*. 355, 85-93.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Martin, E., Vonsattel, J. P., Carraway, R., Reeves, S. A., et al., 1995. Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*. 14, 1075-81.
- Domenici, M. R., Scattoni, M. L., Martire, A., Lastoria, G., Potenza, R. L., Borioni, A., Venerosi, A., Calamandrei, G., Popoli, P., 2007. Behavioral and electrophysiological effects of the adenosine A2A receptor antagonist SCH 58261 in R6/2 Huntington's disease mice. *Neurobiol Dis*. 28, 197-205.
- Dong, E., Nelson, M., Grayson, D. R., Costa, E., Guidotti, A., 2008. Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 13614-9.
- Duda, J. E., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., 2000. Neuropathology of synuclein aggregates. *J Neurosci Res*. 61, 121-7.
- Dunwiddie, T. V., 1980. Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia*. 21, 541-8.
- Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 24, 31-55.
- Dutra, G. P., Ottoni, G. L., Lara, D. R., Bogo, M. R., 2010. Lower frequency of the low activity adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. *Rev Bras Psiquiatr*. 32, 275-8.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Menard, J. F., Parmentier, M., Costentin, J., Vaugeois, J. M., 2000. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol*. 129, 1465-73.
- Ely, S. W., Berne, R. M., 1992. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*. 85, 893-904.
- Fahn S., Greene P. E., Ford B., Bressman S. B., Frucht S. J. 2009. Movement disorders. In Rosemberg (Ed.), *Atlas of Clinical Neurology*. Current Medicine Group, pp 341-394. ISBN: 978-1-57340-283-5. doi: 10.1007/978-1-57340-359-7_9.
- Farber, N. B., 2003. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1003, 119-30.
- Farber, N. B., Newcomer, J. W., Olney, J. W., 1998. The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders. Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*. 116, 421-37.
- Fearnley, J. M., Lees, A. J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*. 114 (Pt 5), 2283-301.
- Fedele, D. E., Gouder, N., Guttinger, M., Gabernet, L., Scheurer, L., Rulicke, T., Crestani, F., Boison, D., 2005. Astroglial in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase, resulting in seizure aggravation. *Brain*. 128, 2383-95.
- Fedele, D. E., Li, T., Lan, J. Q., Fredholm, B. B., Boison, D., 2006. Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol*. 200, 184-90.
- Feng, J., Chang, H., Li, E., Fan, G., 2005. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 79, 734-46.

- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Silva, A. J., Fan, G., 2010. Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci.* 13, 423-30.
- Ferguson, S. S., Zhang, J., Barak, L. S., Caron, M. G., 1998. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.* 62, 1561-5.
- Ferre, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueno, J., Gutierrez, M. A., Casado, V., Fuxe, K., Goldberg, S. R., 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, 11940-5.
- Ferre, S., Quiroz, C., Orru, M., Guitart, X., Navarro, G., Cortes, A., Casado, V., Canela, E. I., Lluís, C., Franco, R., 2011. Adenosine A(2A) Receptors and A(2A) Receptor Heteromers as Key Players in Striatal Function. *Front Neuroanat.* 5, 36.
- Ferre, S., Quiroz, C., Woods, A. S., Cunha, R., Popoli, P., Ciruela, F., Lluís, C., Franco, R., Azdad, K., Schiffmann, S. N., 2008. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des.* 14, 1468-74.
- Ferre, S., Snaprud, P., Fuxe, K., 1993. Opposing actions of an adenosine A2 receptor agonist and a GTP analogue on the regulation of dopamine D2 receptors in rat neostriatal membranes. *Eur J Pharmacol.* 244, 311-5.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 7238-41.
- Ferrer, I., 2012. Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol.* 97, 38-51.
- Ferrer, I., Lopez-Gonzalez, I., Carmona, M., Dalfo, E., Pujol, A., Martinez, A., 2012. Neurochemistry and the non-motor aspects of PD. *Neurobiol Dis.* 46, 508-26.
- 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, 181-94.
- Fink, J. S., Kalda, A., Ryu, H., Stack, E. C., Schwarzschild, M. A., Chen, J. F., Ferrante, R. J., 2004. Genetic and pharmacological inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates 3-nitropropionic acid-induced striatal damage. *J Neurochem.* 88, 538-44.
- Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Ruffoli, R., Soldani, P., Ruggieri, S., Alessandri, M. G., Paparelli, A., 2003. Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci.* 23, 8955-66.
- Fornai, F., Schluter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Busceti, C. L., Pontarelli, F., Battaglia, G., Pellegrini, A., Nicoletti, F., Ruggieri, S., Paparelli, A., Sudhof, T. C., 2005. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 3413-8.
- Franco, R., Ferre, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli, M., Lluís, C., Fuxe, K., 2000. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology.* 23, S50-9.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., Linden, J., 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53, 527-52.
- Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Linden, J., Muller, C. E., 2011. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev.* 63, 1-34.

- Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G., Wasserman, W., 2000. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362, 364-74.
- Fukumoto-Motoshita, M., Matsuura, M., Ohkubo, T., Ohkubo, H., Kanaka, N., Matsushima, E., Taira, M., Kojima, T., Matsuda, T., 2009. Hyperfrontality in patients with schizophrenia during saccade and antisaccade tasks: a study with fMRI. *Psychiatry Clin Neurosci.* 63, 209-17.
- Fuxe, K., Ferre, S., Zoli, M., Agnati, L. F., 1998. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev.* 26, 258-73.
- Fuxe, K., Ungerstedt, U., 1974. Action of caffeine and theophyllamine on supersensitive dopamine receptors: considerable enhancement of receptor response to treatment with DOPA and dopamine receptor agonists. *Med Biol.* 52, 48-54.
- Gai, W. P., Yuan, H. X., Li, X. Q., Power, J. T., Blumbergs, P. C., Jensen, P. H., 2000. In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Exp Neurol.* 166, 324-33.
- Gao, K., Song, Z., Liang, H., Zheng, W., Deng, X., Yuan, Y., Zhao, Y., Deng, H., 2014. Genetic analysis of the ATP1B4 gene in Chinese Han patients with Parkinson's disease. *Mol Biol Rep.*
- Gavin, D. P., Sharma, R. P., 2010. Histone modifications, DNA methylation, and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 34, 882-8.
- Gerardin, E., Pochon, J. B., Poline, J. B., Tremblay, L., Van de Moortele, P. F., Levy, R., Dubois, B., Le Bihan, D., Lehericy, S., 2004. Distinct striatal regions support movement selection, preparation and execution. *Neuroreport.* 15, 2327-31.
- Gerfen, C. R., 2000. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends Neurosci.* 23, S64-70.
- Gerfen, C. R., Surmeier, D. J., 2011. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 34, 441-66.
- Gimenez-Llort, L., Schiffmann, S. N., Shmidt, T., Canela, L., Camon, L., Wassholm, M., Canals, M., Terasmaa, A., Fernandez-Teruel, A., Tobena, A., Popova, E., Ferre, S., Agnati, L., Ciruela, F., Martinez, E., Scheel-Kruger, J., Lluís, C., Franco, R., Fuxe, K., Bader, M., 2007. Working memory deficits in transgenic rats overexpressing human adenosine A2A receptors in the brain. *Neurobiol Learn Mem.* 87, 42-56.
- Gines, S., Bosch, M., Marco, S., Gavalda, N., Diaz-Hernandez, M., Lucas, J. J., Canals, J. M., Alberch, J., 2006. Reduced expression of the TrkB receptor in Huntington's disease mouse models and in human brain. *Eur J Neurosci.* 23, 649-58.
- Ginsborg, B. L., Hirst, G. D., 1972. The effect of adenosine on the release of the transmitter from the phrenic nerve of the rat. *J Physiol.* 224, 629-45.
- Giralt, A., Puigdel·livol, M., Carreton, O., Paoletti, P., Valero, J., Parra-Damas, A., Saura, C. A., Alberch, J., Gines, S., 2012. Long-term memory deficits in Huntington's disease are associated with reduced CBP histone acetylase activity. *Hum Mol Genet.* 21, 1203-16.
- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R. L., 2000. The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. *Neuroscience.* 97, 505-19.
- Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Bruckl, T., Biel, M., Carell, T., 2010. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One.* 5, e15367.
- Golembiowska, K., Zylewska, A., 1998. Agonists of A1 and A2A adenosine receptors attenuate methamphetamine-induced overflow of dopamine in rat striatum. *Brain Res.* 806, 202-9.

- Gomes, C. V., Kaster, M. P., Tome, A. R., Agostinho, P. M., Cunha, R. A., 2011. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1808, 1380-99.
- Gouder, N., Fritschy, J. M., Boison, D., 2003. Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia.* 44, 877-85.
- Gray, J. H., Owen, R. P., Giacomini, K. M., 2004. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch.* 447, 728-34.
- Graybiel, A. M., 1997. The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophr Bull.* 23, 459-69.
- Grayson, D. R., Jia, X., Chen, Y., Sharma, R. P., Mitchell, C. P., Guidotti, A., Costa, E., 2005. Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 9341-6.
- Groenewegen, H. J., 2003. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* 10, 107-20.
- Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R., Tsai, L. H., 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature.* 459, 55-60.
- Gudermann, T., Schoneberg, T., Schultz, G., 1997. Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.* 20, 399-427.
- Gui, Y. X., Xu, Z. P., Wen, L., Liu, H. M., Zhao, J. J., Hu, X. Y., 2013. Four novel rare mutations of PLA2G6 in Chinese population with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 19, 21-6.
- Guidotti, A., Auta, J., Chen, Y., Davis, J. M., Dong, E., Gavin, D. P., Grayson, D. R., Matrisciano, F., Pinna, G., Satta, R., Sharma, R. P., Tremolizzo, L., Tueting, P., 2011. Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology.* 60, 1007-16.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J. M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D. R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., Uzunov, D., Costa, E., 2000. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry.* 57, 1061-9.
- Guidotti, A., Ruzicka, W., Grayson, D. R., Veldic, M., Pinna, G., Davis, J. M., Costa, E., 2007. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA overexpression in psychosis. *Neuroreport.* 18, 57-60.
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., Song, H., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell.* 145, 423-34.
- Hagberg, H., Andersson, P., Lacarewicz, J., Jacobson, I., Butcher, S., Sandberg, M., 1987. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem.* 49, 227-31.
- Hasan, A., Mitchell, A., Schneider, A., Halene, T., Akbarian, S., 2013. Epigenetic dysregulation in schizophrenia: molecular and clinical aspects of histone deacetylase inhibitors. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 263, 273-84.
- Hauser, R. A., Shulman, L. M., Trugman, J. M., Roberts, J. W., Mori, A., Ballerini, R., Sussman, N. M., 2008. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. *Mov Disord.* 23, 2177-85.
- Hellman, A., Chess, A., 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science.* 315, 1141-3.
- Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., Elliston, L. A., Hartog, C., Goldstein, D. R., Thu, D., Hollingsworth, Z. R., Collin, F., Synek, B., Holmans, P. A., Young, A. B., Wexler, N. S., Delorenzi, M., Kooperberg, C., Augood, S.

- J., Faull, R. L., Olson, J. M., Jones, L., Luthi-Carter, R., 2006. Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum Mol Genet.* 15, 965-77.
- Horne, E. A., Coy, J., Swinney, K., Fung, S., Cherry, A. E., Marrs, W. R., Naydenov, A. V., Lin, Y. H., Sun, X., Keene, C. D., Grouzmann, E., Muchowski, P., Bates, G. P., Mackie, K., Stella, N., 2013. Downregulation of cannabinoid receptor 1 from neuropeptide Y interneurons in the basal ganglia of patients with Huntington's disease and mouse models. *Eur J Neurosci.* 37, 429-40.
- Howes, O. D., Egerton, A., Allan, V., McGuire, P., Stokes, P., Kapur, S., 2009. Mechanisms underlying psychosis and antipsychotic treatment response in schizophrenia: insights from PET and SPECT imaging. *Curr Pharm Des.* 15, 2550-9.
- Howes, O. D., Kapur, S., 2009. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull.* 35, 549-62.
- Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Masliah, E., 2000. alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. *Am J Pathol.* 157, 401-10.
- Huang, H. S., Matevosian, A., Jiang, Y., Akbarian, S., 2006. Chromatin immunoprecipitation in postmortem brain. *J Neurosci Methods.* 156, 284-92.
- Huang, N. K., Lin, J. H., Lin, J. T., Lin, C. I., Liu, E. M., Lin, C. J., Chen, W. P., Shen, Y. C., Chen, H. M., Chen, J. B., Lai, H. L., Yang, C. W., Chiang, M. C., Wu, Y. S., Chang, C., Chen, J. F., Fang, J. M., Lin, Y. L., Chern, Y., 2011. A new drug design targeting the adenosinergic system for Huntington's disease. *PLoS One.* 6, e20934.
- Hunsucker, S. A., Spychala, J., Mitchell, B. S., 2001. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem.* 276, 10498-504.
- Hunter, C. J., Bennet, L., Power, G. G., Roelfsema, V., Blood, A. B., Quaedackers, J. S., George, S., Guan, J., Gunn, A. J., 2003. Key neuroprotective role for endogenous adenosine A1 receptor activation during asphyxia in the fetal sheep. *Stroke.* 34, 2240-5.
- Ikeda, S. R., 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature.* 380, 255-8.
- Impagnatiello, F., Guidotti, A. R., Pesold, C., Dwivedi, Y., Caruncho, H., Pisu, M. G., Uzunov, D. P., Smalheiser, N. R., Davis, J. M., Pandey, G. N., Pappas, G. D., Tueting, P., Sharma, R. P., Costa, E., 1998. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 15718-23.
- Irizarry, M. C., Growdon, W., Gomez-Isla, T., Newell, K., George, J. M., Clayton, D. F., Hyman, B. T., 1998. Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 57, 334-7.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., Ijzerman, A. P., Stevens, R. C., 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science.* 322, 1211-7.
- Jacobson, K. A., Gao, Z. G., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 247-64.
- Jacobson, K. A., Hoffmann, C., Cattabeni, F., Abbracchio, M. P., 1999. Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis.* 4, 197-211.
- Jin, J., Cheng, Y., Zhang, Y., Wood, W., Peng, Q., Hutchison, E., Mattson, M. P., Becker, K. G., Duan, W., 2012. Interrogation of brain miRNA and mRNA expression profiles reveals a molecular regulatory network that is perturbed by mutant huntingtin. *J Neurochem.* 123, 477-90.
- Jin, S. G., Kadam, S., Pfeifer, G. P., 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Res.* 38, e125.

- Johansson, B., Halldner, L., Dunwiddie, T. V., Masino, S. A., Poelchen, W., Gimenez-Llort, L., Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X. J., Hardemark, A., Betsholtz, C., Herlenius, E., Fredholm, B. B., 2001. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 9407-12.
- Johnson, R., Zuccato, C., Belyaev, N. D., Guest, D. J., Cattaneo, E., Buckley, N. J., 2008. A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 29, 438-45.
- Jovicic, A., Roshan, R., Moiso, N., Pradervand, S., Moser, R., Pillai, B., Luthi-Carter, R., 2013. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *J Neurosci.* 33, 5127-37.
- Jowaed, A., Schmitt, I., Kaut, O., Wullner, U., 2010. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J Neurosci.* 30, 6355-9.
- Kafka, S. H., Corbett, R., 1996. Selective adenosine A2A receptor/dopamine D2 receptor interactions in animal models of schizophrenia. *Eur J Pharmacol.* 295, 147-54.
- Karayorgou, M., Morris, M. A., Morrow, B., Shprintzen, R. J., Goldberg, R., Borrow, J., Gos, A., Nestadt, G., Wolyniec, P. S., Lasseter, V. K., et al., 1995. Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 7612-6.
- Kaut, O., Schmitt, I., Wullner, U., 2012. Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. *Neurogenetics.* 13, 87-91.
- Kay, S. R., Fiszbein, A., Opler, L. A., 1987. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 13, 261-76.
- Kemp, J. M., 1968. Observations on the caudate nucleus of the cat impregnated with the Golgi method. *Brain Res.* 11, 467-70.
- Kemp, J. M., Powell, T. P., 1971. The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 262, 383-401.
- Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W. B., Voronov, S. V., Murchison, E., Hannon, G., Abeliovich, A., 2007. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science.* 317, 1220-4.
- Kim, S. H., Lee, H. Y., Yi, H., Ahn, Y. M., Kim, Y. S., 2012. Haloperidol induces demethylation and expression of the dual specificity phosphatase 6 gene in MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells. *Life Sci.* 91, 1317-22.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N., 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392, 605-8.
- Kolshus, E., Dalton, V. S., Ryan, K. M., McLoughlin, D. M., 2013. When less is more - microRNAs and psychiatric disorders. *Acta Psychiatr Scand.*
- Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F., 2000. Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs.* 9, 551-64.
- Kozielska, M., Pilla Reddy, V., Johnson, M., de Ridder, F., Vermeulen, A., Liu, J., Groothuis, G. M., Danhof, M., Proost, J. H., 2013. Sensitivity of individual items of the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) and items subgroups to differentiate between placebo and drug treatment in schizophrenia. *Schizophr Res.* 146, 53-8.
- Krebs, M. O., Bourdel, M. C., Cherif, Z. R., Bouhours, P., Loo, H., Poirier, M. F., Amado, I., 2010. Deficit of inhibition motor control in untreated patients with schizophrenia: further support from visually guided saccade paradigms. *Psychiatry Res.* 179, 279-84.

- Kriaucionis, S., Heintz, N., 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 324, 929-30.
- Kruger, R., Kuhn, W., Muller, T., Woitalla, D., Graeber, M., Kosel, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., Schols, L., Riess, O., 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 18, 106-8.
- Kruger, R., Sharma, M., Riess, O., Gasser, T., Van Broeckhoven, C., Theuns, J., Aasly, J., Annesi, G., Bentivoglio, A. R., Brice, A., Djarmati, A., Elbaz, A., Farrer, M., Ferrarese, C., Gibson, J. M., Hadjigeorgiou, G. M., Hattori, N., Ioannidis, J. P., Jasinska-Myga, B., Klein, C., Lambert, J. C., Lesage, S., Lin, J. J., Lynch, T., Mellick, G. D., de Nigris, F., Opala, G., Prigione, A., Quattrone, A., Ross, O. A., Satake, W., Silburn, P. A., Tan, E. K., Toda, T., Tomiyama, H., Wirdefeldt, K., Wszolek, Z., Xiomerisiou, G., Maraganore, D. M., 2011. A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 32, 548 e9-18.
- Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A., Strand, A. D., Sengstag, T., Kooperberg, C., Becanovic, K., Pouladi, M. A., Sathasivam, K., Cha, J. H., Hannan, A. J., Hayden, M. R., Leavitt, B. R., Dunnett, S. B., Ferrante, R. J., Albin, R., Shelbourne, P., Delorenzi, M., Augood, S. J., Faull, R. L., Olson, J. M., Bates, G. P., Jones, L., Luthi-Carter, R., 2007. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum Mol Genet*. 16, 1845-61.
- Kull, B., Svenningsson, P., Fredholm, B. B., 2000. Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Mol Pharmacol*. 58, 771-7.
- Kundakovic, M., Chen, Y., Guidotti, A., Grayson, D. R., 2009. The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes. *Mol Pharmacol*. 75, 342-54.
- Kurumaji, A., Toru, M., 1998. An increase in [3H] CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res*. 808, 320-3.
- Kuss, A. W., Chen, W., 2008. MicroRNAs in brain function and disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 8, 190-7.
- Lang, U. E., Puls, I., Muller, D. J., Strutz-Seebom, N., Gallinat, J., 2007. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem*. 20, 687-702.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219, 979-80.
- Lara, D. R., 2002. Inhibitory deficit in schizophrenia is not necessarily a GABAergic deficit. *Cell Mol Neurobiol*. 22, 239-47.
- Lara, D. R., Brunstein, M. G., Ghisolfi, E. S., Lobato, M. I., Belmonte-de-Abreu, P., Souza, D. O., 2001. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol*. 16, 235-7.
- Lara, D. R., Dall'Igna, O. P., Ghisolfi, E. S., Brunstein, M. G., 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30, 617-29.
- Lara, D. R., Souza, D. O., 2000. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Med Hypotheses*. 54, 157-66.
- Larrayoz, I. M., Casado, F. J., Pastor-Anglada, M., Lostao, M. P., 2004. Electrophysiological characterization of the human Na(+)/nucleoside cotransporter 1 (hCNT1) and role of adenosine on hCNT1 function. *J Biol Chem*. 279, 8999-9007.
- Larrison, A. L., Babin, S. L., Xing, Y., Patel, S. S., Wassef, A. A., Sereno, A. B., 2011. Effects of adjunct valproic acid on clinical symptoms and saccadic eye movements in schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*. 26, 517-25.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., Innis, R., 1999. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry*. 46, 56-72.

- Latini, S., Corsi, C., Pedata, F., Pepeu, G., 1995. The source of brain adenosine outflow during ischemia and electrical stimulation. *Neurochem Int.* 27, 239-44.
- Latini, S., Pedata, F., 2001. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 79, 463-84.
- Lawrence, A. D., Sahakian, B. J., Robbins, T. W., 1998. Cognitive functions and corticostriatal circuits: insights from Huntington's disease. *Trends Cogn Sci.* 2, 379-88.
- Le, F., Townsend-Nicholson, A., Baker, E., Sutherland, G. R., Schofield, P. R., 1996. Characterization and chromosomal localization of the human A2a adenosine receptor gene: ADORA2A. *Biochem Biophys Res Commun.* 223, 461-7.
- Lee, F. S., Chao, M. V., 2001. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 3555-60.
- Lehericy, S., Ducros, M., Van de Moortele, P. F., Francois, C., Thivard, L., Poupon, C., Swindale, N., Ugurbil, K., Kim, D. S., 2004. Diffusion tensor fiber tracking shows distinct corticostriatal circuits in humans. *Ann Neurol.* 55, 522-9.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M. J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P. J., Wilkinson, K. D., Polymeropoulos, M. H., 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 395, 451-2.
- Levenson, J. M., 2007. DNA (cytosine-5) methyltransferase inhibitors: a potential therapeutic agent for schizophrenia. *Mol Pharmacol.* 71, 635-7.
- Levenson, J. M., Sweatt, J. D., 2005. Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci.* 6, 108-18.
- LeWitt, P. A., Guttman, M., Tetrud, J. W., Tuite, P. J., Mori, A., Chaikin, P., Sussman, N. M., 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.
- Li, E., Bestor, T. H., Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 69, 915-26.
- Li, S. H., Cheng, A. L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., Li, X. J., 2002. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol Cell Biol.* 22, 1277-87.
- Li, W., Liu, M., 2011. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids.* 2011, 870726.
- Li, X. X., Nomura, T., Aihara, H., Nishizaki, T., 2001. Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors. *Life Sci.* 68, 1343-50.
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D., Felsenfeld, G., 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* 293, 2453-5.
- Litvan, I., Bhatia, K. P., Burn, D. J., Goetz, C. G., Lang, A. E., McKeith, I., Quinn, N., Sethi, K. D., Shults, C., Wenning, G. K., 2003. Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. *Mov Disord.* 18, 467-86.
- Liu, D. Z., Xie, K. Q., Ji, X. Q., Ye, Y., Jiang, C. L., Zhu, X. Z., 2005. Neuroprotective effect of paeoniflorin on cerebral ischemic rat by activating adenosine A1 receptor in a manner different from its classical agonists. *Br J Pharmacol.* 146, 604-11.
- Liu, X. X., Wilson, K., Charlton, C. G., 2000. Effects of L-dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-dopa. *Life Sci.* 66, 2277-88.
- Liu, Z. W., Gao, X. B., 2007. Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: a possible sleep-promoting effect. *J Neurophysiol.* 97, 837-48.

- Lodi, R., Schapira, A. H., Manners, D., Styles, P., Wood, N. W., Taylor, D. J., Warner, T. T., 2000. Abnormal in vivo skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann Neurol.* 48, 72-6.
- Londos, C., Cooper, D. M., Wolff, J., 1980. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 2551-4.
- Lopez-Serra, L., Esteller, M., 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer.* 98, 1881-5.
- Lukasiewicz, S., Blasiak, E., Faron-Gorecka, A., Polit, A., Tworzydło, M., Gorecki, A., Wasylewski, Z., Dziedzicka-Wasylewska, M., 2007. Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A2A and serotonin 5-HT1A receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane. *Pharmacol Rep.* 59, 379-92.
- Luscher, C., Jan, L. Y., Stoffel, M., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., 1997. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron.* 19, 687-95.
- 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, 332-3.
- MacDonald, R. L., Skerritt, J. H., Werz, M. A., 1986. Adenosine agonists reduce voltage-dependent calcium conductance of mouse sensory neurones in cell culture. *J Physiol.* 370, 75-90.
- Marti, E., Pantano, L., Banez-Coronel, M., Llorens, F., Miñones-Moyano, E., Porta, S., Sumoy, L., Ferrer, I., Estivill, X., 2010. A myriad of miRNA variants in control and Huntington's disease brain regions detected by massively parallel sequencing. *Nucleic Acids Res.* 38, 7219-35.
- Martin, E. D., Fernandez, M., Perea, G., Pascual, O., Haydon, P. G., Araque, A., Cena, V., 2007. Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia.* 55, 36-45.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., Cuervo, A. M., 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci.* 13, 567-76.
- Martins-Taylor, K., Schroeder, D. I., LaSalle, J. M., Lalande, M., Xu, R. H., 2012. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics.* 7, 71-82.
- Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D. R., Davis, J. M., Nicoletti, F., Guidotti, A., 2013. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology.* 68, 184-94.
- Mayne, M., Fotheringham, J., Yan, H. J., Power, C., Del Bigio, M. R., Peeling, J., Geiger, J. D., 2001. Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol.* 49, 727-35.
- McGeorge, A. J., Faull, R. L., 1989. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience.* 29, 503-37.
- McNaught, K. S., Bjorklund, L. M., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., Olanow, C. W., 2002. Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport.* 13, 1437-41.
- Meagher, D. J., Leonard, M., Donnelly, S., Conroy, M., Adamis, D., Trzepacz, P. T., 2012. A longitudinal study of motor subtypes in delirium: frequency and stability during episodes. *J Psychosom Res.* 72, 236-41.
- Meza-Sosa, K. F., Valle-Garcia, D., Pedraza-Alva, G., Perez-Martinez, L., 2012. Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. *J Neurosci Res.* 90, 1-12.

- Mievis, S., Blum, D., Ledent, C., 2011. A2A receptor knockout worsens survival and motor behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 41, 570-6.
- Miller, C. A., Campbell, S. L., Sweatt, J. D., 2008. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.* 89, 599-603.
- Mingote, S., Pereira, M., Farrar, A. M., McLaughlin, P. J., Salamone, J. D., 2008. Systemic administration of the adenosine A(2A) agonist CGS 21680 induces sedation at doses that suppress lever pressing and food intake. *Pharmacol Biochem Behav.* 89, 345-51.
- Mink, J. W., 2003. The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch Neurol.* 60, 1365-8.
- Miñones-Moyano, E., Porta, S., Escaramis, G., Rabionet, R., Iraola, S., Kagerbauer, B., Espinosa-Parrilla, Y., Ferrer, I., Estivill, X., Marti, E., 2011. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet.* 20, 3067-78.
- Mishina, M., Ishiwata, K., Kimura, Y., Naganawa, M., Oda, K., Kobayashi, S., Katayama, Y., Ishii, K., 2007. Evaluation of distribution of adenosine A2A receptors in normal human brain measured with [¹¹C]TMSX PET. *Synapse.* 61, 778-84.
- Mitchell, J. B., Lupica, C. R., Dunwiddie, T. V., 1993. Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 13, 3439-47.
- Mizuno, Y., Kondo, T., 2013. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 28, 1138-41.
- Monopoli, A., Lozza, G., Forlani, A., Mattavelli, A., Ongini, E., 1998. Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *Neuroreport.* 9, 3955-9.
- Muller, T., Woitalla, D., Hauptmann, B., Fowler, B., Kuhn, W., 2001. Decrease of methionine and S-adenosylmethionine and increase of homocysteine in treated patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 308, 54-6.
- Murphy, K. C., 2005. Annotation: velo-cardio-facial syndrome. *J Child Psychol Psychiatry.* 46, 563-71.
- Na, E. S., Nelson, E. D., Kavalali, E. T., Monteggia, L. M., 2013. The impact of MeCP2 loss- or gain-of-function on synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology.* 38, 212-9.
- Narayan, P., Dragunow, M., 2010. Pharmacology of epigenetics in brain disorders. *Br J Pharmacol.* 159, 285-303.
- Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J. D., Phillips, A. G., Hayden, M. R., 1995. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell.* 81, 811-23.
- Navarro, G., Carriba, P., Gandia, J., Ciruela, F., Casado, V., Cortes, A., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., Franco, R., 2008. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal.* 8, 1088-97.
- Neumann, C. S., Grimes, K., Walker, E. F., Baum, K., 1995. Developmental pathways to schizophrenia: behavioral subtypes. *J Abnorm Psychol.* 104, 558-66.
- Newby, A. C., 1984. Adenosine and the concept of 'retaliatory metabolites'. *Trends in Biochemical Science.* 9, 42-44.
- Ng, C. W., Yildirim, F., Yap, Y. S., Dalin, S., Matthews, B. J., Velez, P. J., Labadorf, A., Housman, D. E., Fraenkel, E., 2013. Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 2354-9.

- Noh, J. S., Sharma, R. P., Veldic, M., Salvacion, A. A., Jia, X., Chen, Y., Costa, E., Guidotti, A., Grayson, D. R., 2005. DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 1749-54.
- Noma, K., Allis, C. D., Grewal, S. I., 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science.* 293, 1150-5.
- Nussbaum, R. L., Ellis, C. E., 2003. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 348, 1356-64.
- Obeid, R., Kasoha, M., Knapp, J. P., Kostopoulos, P., Becker, G., Fassbender, K., Herrmann, W., 2007. Folate and methylation status in relation to phosphorylated tau protein(181P) and beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 53, 1129-36.
- Obeid, R., Schadt, A., Dillmann, U., Kostopoulos, P., Fassbender, K., Herrmann, W., 2009. Methylation status and neurodegenerative markers in Parkinson disease. *Clin Chem.* 55, 1852-60.
- Obeso, J. A., Linazasoro, G., Guridi, J., Ramos, E., Rodriguez-Oroz, M. C., 2000a. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus and levodopa induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 68, 122-3.
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Rodriguez, M., DeLong, M. R., Olanow, C. W., 2000b. Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: problems with the current model. *Ann Neurol.* 47, S22-32; discussion S32-4.
- Offermanns, S., Simon, M. I., 1998. Genetic analysis of mammalian G-protein signalling. *Oncogene.* 17, 1375-81.
- Okada, M., Mizuno, K., Kaneko, S., 1996. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett.* 212, 53-6.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99, 247-57.
- Ossowska, K., 2002. Neuronal basis of neuroleptic-induced extrapyramidal side effects. *Pol J Pharmacol.* 54, 299-312.
- Palacios, N., Gao, X., McCullough, M. L., Schwarzschild, M. A., Shah, R., Gapstur, S., Ascherio, A., 2012. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord.* 27, 1276-82.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A., North, R. A., 2006. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch.* 452, 589-97.
- Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., Greenamyre, J. T., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci.* 5, 731-6.
- Papakostas, G. I., 2009. Evidence for S-adenosyl-L-methionine (SAM-e) for the treatment of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* 70 Suppl 5, 18-22.
- Pappa, S., Dazzan, P., 2009. Spontaneous movement disorders in antipsychotic-naive patients with first-episode psychoses: a systematic review. *Psychol Med.* 39, 1065-76.
- Park, K. S., Jeong, S. W., Cha, S. K., Lee, B. S., Kong, I. D., Ikeda, S. R., Lee, J. W., 2001. Modulation of N-type Ca²⁺ currents by A1-adenosine receptor activation in male rat pelvic ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 501-8.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J. Y., Takano, H., Moss, S. J., McCarthy, K., Haydon, P. G., 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 310, 113-6.
- Penney, J. B., Jr., Young, A. B., 1982. Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington disease. *Neurology.* 32, 1391-5.
- Peralta, V., Campos, M. S., De Jalon, E. G., Cuesta, M. J., 2010. Motor behavior abnormalities in drug-naive patients with schizophrenia spectrum disorders. *Mov Disord.* 25, 1068-76.
- Petri, R., Malmevik, J., Fasching, L., Akerblom, M., Jakobsson, J., 2014. miRNAs in brain development. *Exp Cell Res.* 321, 84-9.

- Pezzoli, G., Zini, M., 2010. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. *Expert Opin Pharmacother.* 11, 627-35.
- Phillips, E., Newsholme, E. A., 1979. Maximum activities, properties and distribution of 5' nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in rat and human brain. *J Neurochem.* 33, 553-8.
- Phillis, J. W., Edstrom, J. P., Kostopoulos, G. K., Kirkpatrick, J. R., 1979. Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol.* 57, 1289-312.
- Pintor, A., Quarta, D., Pezzola, A., Reggio, R., Popoli, P., 2001. SCH 58261 (an adenosine A(2A) receptor antagonist) reduces, only at low doses, K(+)-evoked glutamate release in the striatum. *Eur J Pharmacol.* 421, 177-80.
- Poltorak, M., Wright, R., Hemperly, J. J., Torrey, E. F., Issa, F., Wyatt, R. J., Freed, W. J., 1997. Monozygotic twins discordant for schizophrenia are discordant for N-CAM and L1 in CSF. *Brain Res.* 751, 152-4.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., Nussbaum, R. L., 1997. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 276, 2045-7.
- Popoli, P., Betto, P., Reggio, R., Ricciarello, G., 1995. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur J Pharmacol.* 287, 215-7.
- Popoli, P., Blum, D., Domenici, M. R., Burnouf, S., Chern, Y., 2008. A critical evaluation of adenosine A2A receptors as potentially "druggable" targets in Huntington's disease. *Curr Pharm Des.* 14, 1500-11.
- Popoli, P., Blum, D., Martire, A., Ledent, C., Ceruti, S., Abbracchio, M. P., 2007. Functions, dysfunctions and possible therapeutic relevance of adenosine A2A receptors in Huntington's disease. *Prog Neurobiol.* 81, 331-48.
- Popoli, P., Gimenez-Llort, L., Pezzola, A., Reggio, R., Martinez, E., Fuxe, K., Ferre, S., 1996. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. *Neurosci Lett.* 218, 209-13.
- Popoli, P., Pezzola, A., de Carolis, A. S., 1994. Modulation of striatal adenosine A1 and A2 receptors induces rotational behaviour in response to dopaminergic stimulation in intact rats. *Eur J Pharmacol.* 257, 21-5.
- Popoli, P., Pintor, A., Domenici, M. R., Frank, C., Tebano, M. T., Pezzola, 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, 1967-75.
- Porkka-Heiskanen, T., Strecker, R. E., Thakkar, M., Bjorkum, A. A., Greene, R. W., McCarley, R. W., 1997. Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science.* 276, 1265-8.
- Portela, A., Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28, 1057-68.
- Raemaekers, M., Jansma, J. M., Cahn, W., Van der Geest, J. N., van der Linden, J. A., Kahn, R. S., Ramsey, N. F., 2002. Neuronal substrate of the saccadic inhibition deficit in schizophrenia investigated with 3-dimensional event-related functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry.* 59, 313-20.
- Rajput, A. H., Fenton, M. E., Birdi, S., Macaulay, R., George, D., Rozdilsky, B., Ang, L. C., Senthilselvan, A., Hornykiewicz, O., 2002. Clinical-pathological study of levodopa complications. *Mov Disord.* 17, 289-96.

- Reddington, M., Pusch, R., 1983. Adenosine metabolism in a rat hippocampal slice preparation: incorporation into S-adenosylhomocysteine. *J Neurochem.* 40, 285-90.
- Rees, E., Kirov, G., Sanders, A., Walters, J. T., Chambert, K. D., Shi, J., Szatkiewicz, J., O'Dushlaine, C., Richards, A. L., Green, E. K., Jones, I., Davies, G., Legge, S. E., Moran, J. L., Pato, C., Pato, M., Genovese, G., Levinson, D., Duan, J., Moy, W., Goring, H. H., Morris, D., Cormican, P., Kendler, K. S., O'Neill, F. A., Riley, B., Gill, M., Corvin, A., Craddock, N., Sklar, P., Hultman, C., Sullivan, P. F., Gejman, P. V., McCarroll, S. A., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., 2014. Evidence that duplications of 22q11.2 protect against schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 19, 37-40.
- Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., Young, A. B., 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 5733-7.
- Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M., de Mendonca, A., 2002. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol.* 68, 377-92.
- Robertson, G. S., Fibiger, H. C., 1992. Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience.* 46, 315-28.
- Robertson, G. S., Matsumura, H., Fibiger, H. C., 1994. Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 271, 1058-66.
- Robledo, P., Ursu, G., Mahy, N., 1999. Effects of adenosine and gamma-aminobutyric acid A receptor antagonists on N-methyl-D-aspartate induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *Hippocampus.* 9, 527-33.
- Rosin, D. L., Robeva, A., Woodard, R. L., Guyenet, P. G., Linden, J., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 401, 163-86.
- Ross, C. A., 2002. Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron.* 35, 819-22.
- Ross, C. A., Poirier, M. A., 2005. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 891-8.
- Sadri-Vakili, G., Cha, J. H., 2006. Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington's disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 2, 330-8.
- Saft, C., Lauter, T., Kraus, P. H., Przuntek, H., Andrich, J. E., 2006. Dose-dependent improvement of myoclonic hyperkinesia due to Valproic acid in eight Huntington's Disease patients: a case series. *BMC Neurol.* 6, 11.
- Salimi, S., Fotouhi, A., Ghoreishi, A., Derakhshan, M. K., Khodaie-Ardakani, M. R., Mohammadi, M. R., Noorbala, A. A., Ahmadi-Abhari, S. A., Hajiazim, M., Abbasi, S. H., Akhondzadeh, S., 2008. A placebo controlled study of the propentofylline added to risperidone in chronic schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32, 726-32.
- Sanger, T. D., Chen, D., Fehlings, D. L., Hallett, M., Lang, A. E., Mink, J. W., Singer, H. S., Alter, K., Ben-Pazi, H., Butler, E. E., Chen, R., Collins, A., Dayanidhi, S., Forssberg, H., Fowler, E., Gilbert, D. L., Gorman, S. L., Gormley, M. E., Jr., Jinnah, H. A., Kornblau, B., Krosschell, K. J., Lehman, R. K., MacKinnon, C., Malanga, C. J., Mesterman, R., Michaels, M. B., Pearson, T. S., Rose, J., Russman, B. S., Sternad, D., Swoboda, K. J., Valero-Cuevas, F., 2010. Definition and classification of hyperkinetic movements in childhood. *Mov Disord.* 25, 1538-49.
- Sawynok, J., Sweeney, M. I., 1989. The role of purines in nociception. *Neuroscience.* 32, 557-69.
- Schiffmann, S. N., Fisone, G., Moresco, R., Cunha, R. A., Ferre, S., 2007. Adenosine A2A receptors and basal ganglia physiology. *Prog Neurobiol.* 83, 277-92.
- Scholfield, C. N., 1978. Depression of evoked potentials in brain slices by adenosine compounds. *Br J Pharmacol.* 63, 239-44.

- Schulte, G., Fredholm, B. B., 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 15, 813-27.
- Schwab, S. G., Hallmayer, J., Lerer, B., Albus, M., Borrmann, M., Honig, S., Strauss, M., Segman, R., Lichtermann, D., Knapp, M., Trixler, M., Maier, W., Wildenauer, D. B., 1998. Support for a chromosome 18p locus conferring susceptibility to functional psychoses in families with schizophrenia, by association and linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 63, 1139-52.
- Sebastiao, A. M., Ribeiro, J. A., 2009. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. *Curr Neuropharmacol.* 7, 180-94.
- Seeman, P., 2006. Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets.* 10, 515-31.
- Selten, J. P., Cantor-Graae, E., 2005. Social defeat: risk factor for schizophrenia? *Br J Psychiatry.* 187, 101-2.
- Semchuk, K. M., Love, E. J., Lee, R. G., 1992. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology.* 42, 1328-35.
- Sharma, R. P., Rosen, C., Kartan, S., Guidotti, A., Costa, E., Grayson, D. R., Chase, K., 2006. Valproic acid and chromatin remodeling in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary results from a clinical population. *Schizophr Res.* 88, 227-31.
- Sharp, A. H., Ross, C. A., 1996. Neurobiology of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 3, 3-15.
- Shen, H. Y., Coelho, J. E., Ohtsuka, N., Canas, P. M., Day, Y. J., Huang, Q. Y., Rebola, N., Yu, L., Boison, D., Cunha, R. A., Linden, J., Tsien, J. Z., Chen, J. F., 2008. A critical role of the adenosine A2A receptor in extrastriatal neurons in modulating psychomotor activity as revealed by opposite phenotypes of striatum and forebrain A2A receptor knock-outs. *J Neurosci.* 28, 2970-5.
- Shen, H. Y., Singer, P., Lytle, N., Wei, C. J., Lan, J. Q., Williams-Karnesky, R. L., Chen, J. F., Yee, B. K., Boison, D., 2012. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest.* 122, 2567-77.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T., 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 25, 302-5.
- Simpson, E. H., Kellendonk, C., Kandel, E., 2010. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron.* 65, 585-96.
- Soldati, C., Bithell, A., Johnston, C., Wong, K. Y., Stanton, L. W., Buckley, N. J., 2013. Dysregulation of REST-regulated coding and non-coding RNAs in a cellular model of Huntington's disease. *J Neurochem.* 124, 418-30.
- Solinas, M., Ferre, S., You, Z. B., Karcz-Kubicha, M., Popoli, P., Goldberg, S. R., 2002. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci.* 22, 6321-4.
- Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C. H., Zhang, W., Jian, X., Wang, J., Zhang, L., Looney, T. J., Zhang, B., Godley, L. A., Hicks, L. M., Lahn, B. T., Jin, P., He, C., 2011. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol.* 29, 68-72.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., Goedert, M., 1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388, 839-40.
- Spremulli, E. N., Cummings, F. J., Crabtree, G. W., LaBresh, K., Jordan, M., Calabresi, P., 1983. Hemodynamic effects of potentially useful antineoplastic agents. *J Natl Cancer Inst.* 70, 499-504.
- Spychala, J., Mitchell, B. S., Barankiewicz, J., 1997. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. *J Immunol.* 158, 4947-52.

- Stacy, M., Silver, D., Mendis, T., Sutton, J., Mori, A., Chaikin, P., Sussman, N. M., 2008. A 12-week, placebo-controlled study (6002-US-006) of istradefylline in Parkinson disease. *Neurology*. 70, 2233-40.
- Stefanis, L., Larsen, K. E., Rideout, H. J., Sulzer, D., Greene, L. A., 2001. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *J Neurosci*. 21, 9549-60.
- Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., Wanker, E. E., Bates, G. P., Housman, D. E., Thompson, L. M., 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 6763-8.
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., Fields, R. D., 2002. Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*. 36, 855-68.
- Stoof, J. C., Kebejian, J. W., 1981. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*. 294, 366-8.
- Strahl, B. D., Allis, C. D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403, 41-5.
- Strous, R. D., Ritsner, M. S., Adler, S., Ratner, Y., Maayan, R., Kotler, M., Lachman, H., Weizman, A., 2009. Improvement of aggressive behavior and quality of life impairment following S-adenosyl-methionine (SAM-e) augmentation in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 19, 14-22.
- Sunahori, K., Juang, Y. T., 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, 1500-8.
- Svenningsson, P., Hall, H., Sedvall, G., Fredholm, B. B., 1997. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse*. 27, 322-35.
- Svenningsson, P., Le Moine, C., Fisone, G., Fredholm, B. B., 1999. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol*. 59, 355-96.
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., Rao, A., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 324, 930-5.
- Takahashi, S., 2013. Heterogeneity of schizophrenia: Genetic and symptomatic factors. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 162B, 648-52.
- Takahashi, S., Ohtsuki, T., Yu, S. Y., Tanabe, E., Yara, K., Kamioka, M., Matsushima, E., Matsuura, M., Ishikawa, K., Minowa, Y., Noguchi, E., Nakayama, J., Yamakawa-Kobayashi, K., Arinami, T., Kojima, T., 2003. Significant linkage to chromosome 22q for exploratory eye movement dysfunction in schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 123B, 27-32.
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R. K., Wanner, T., Tanzi, R. E., Sawa, A., V, L. D., Dawson, T. M., Ross, C. A., 2001. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*. 10, 919-26.
- Tarditi, A., Camurri, A., Varani, K., Borea, P. A., Woodman, B., Bates, G., Cattaneo, E., Abbracchio, M. P., 2006. Early and transient alteration of adenosine A2A receptor signaling in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol Dis*. 23, 44-53.
- Tebano, M. T., Martire, A., Potenza, R. L., Gro, C., Pepponi, R., Armida, M., Domenici, M. R., Schwarzschild, M. A., Chen, J. F., Popoli, P., 2008. Adenosine A(2A) receptors are required for normal BDNF levels and BDNF-induced potentiation of synaptic transmission in the mouse hippocampus. *J Neurochem*. 104, 279-86.

- The Huntington's Disease Collaborative Group, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 72, 971-83.
- Thompson, S. M., Haas, H. L., Gahwiler, B. H., 1992. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol*. 451, 347-63.
- Tipton, K. F., Singer, T. P., 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem*. 61, 1191-206.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E. C., Mandel, J. L., 1995. Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat Genet*. 10, 104-10.
- Tsuang, M. T., Faraone, S. V., 1995. The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Res*. 17, 161-75.
- Urduinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V., Esteller, M., 2009. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol*. 8, 1056-72.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G., Wood, N. W., 2004. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 304, 1158-60.
- Valinluck, V., Tsai, H. H., Rogstad, D. K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L. C., 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*. 32, 4100-8.
- van Harten, P. N., Tenback, D. E., 2009. Movement disorders should be a criterion for schizophrenia in DSM-V. *Psychol Med*. 39, 1754-5; author reply 1755-6.
- van Os, J., 2009. 'Salience syndrome' replaces 'schizophrenia' in DSM-V and ICD-11: psychiatry's evidence-based entry into the 21st century? *Acta Psychiatr Scand*. 120, 363-72.
- Varani, K., Rigamonti, D., Sipione, S., Camurri, A., Borea, P. A., Cattabeni, F., Abbracchio, M. P., Cattaneo, E., 2001. Aberrant amplification of A(2A) receptor signaling in striatal cells expressing mutant huntingtin. *FASEB J*. 15, 1245-7.
- Varani, K., Vincenzi, F., Tosi, A., Gessi, S., Casetta, I., Granieri, G., Fazio, P., Leung, E., MacLennan, S., Granieri, E., Borea, P. A., 2010. A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF-alpha levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. *FASEB J*. 24, 587-98.
- Veldic, M., Guidotti, A., Maloku, E., Davis, J. M., Costa, E., 2005. In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 2152-7.
- Veldic, M., Kadriu, B., Maloku, E., Agis-Balboa, R. C., Guidotti, A., Davis, J. M., Costa, E., 2007. Epigenetic mechanisms expressed in basal ganglia GABAergic neurons differentiate schizophrenia from bipolar disorder. *Schizophr Res*. 91, 51-61.
- Vink, M., Kahn, R. S., Raemaekers, M., van den Heuvel, M., Boersma, M., Ramsey, N. F., 2005. Function of striatum beyond inhibition and execution of motor responses. *Hum Brain Mapp*. 25, 336-44.
- Vonsattel, J. P., 2008. Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 115, 55-69.
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., Richardson, E. P., Jr., 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 44, 559-77.
- Vreugdenhil, E., Berezikov, E., 2010. Fine-tuning the brain: MicroRNAs. *Front Neuroendocrinol*. 31, 128-33.

- Walker, E. F., 1994. Developmentally moderated expressions of the neuropathology underlying schizophrenia. *Schizophr Bull.* 20, 453-80.
- Wan, J. Y., Edwards, K. L., Hutter, C. M., Mata, I. F., Samii, A., Roberts, J. W., Agarwal, P., Checkoway, H., Farin, F. M., Yearout, D., Zabetian, C. P., 2014. Association mapping of the PARK10 region for Parkinson's disease susceptibility genes. *Parkinsonism Relat Disord.* 20, 93-8.
- Wan, O. W., Chung, K. K., 2012. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS One.* 7, e38545.
- Wang, L., Guo, J. F., Zhang, W. W., Xu, Q., Zuo, X., Shi, C. H., Luo, L. Z., Liu, J., Hu, L., Hu, Y. C., Yan, X. X., Tang, B. S., 2011. Follow-up study of variants of the GIGYF2 gene in Chinese patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci.* 18, 1699-701.
- Wassef, A. A., Dott, S. G., Harris, A., Brown, A., O'Boyle, M., Meyer, W. J., 3rd, Rose, R. M., 2000. Randomized, placebo-controlled pilot study of divalproex sodium in the treatment of acute exacerbations of chronic schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 20, 357-61.
- Wu, H., Zhang, Y., 2011. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25, 2436-52.
- Xiu, X., Song, Z., Gao, K., Deng, X., Qi, Y., Zhu, A., Gong, L., Deng, H., 2013. Genetic analysis of the FBXO48 gene in Chinese Han patients with Parkinson disease. *Neurosci Lett.* 541, 224-6.
- Yeh, H. H., Young, D., Gelovani, J. G., Robinson, A., Davidson, Y., Herholz, K., Mann, D. M., 2013. Histone deacetylase class II and acetylated core histone immunohistochemistry in human brains with Huntington's disease. *Brain Res.* 1504, 16-24.
- Yin, H. H., Knowlton, B. J., 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci.* 7, 464-76.
- 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. *Eur J Neurosci.* 28, 2267-77.
- Yu, L., Frith, M. C., Suzuki, Y., Peterfreund, R. A., Gearan, T., Sugano, S., Schwarzschild, M. A., Weng, Z., Fink, J. S., Chen, J. F., 2004. Characterization of genomic organization of the adenosine A2A receptor gene by molecular and bioinformatics analyses. *Brain Res.* 1000, 156-73.
- Zetterstrom, T., Vernet, L., Ungerstedt, U., Tossman, U., Jonzon, B., Fredholm, B. B., 1982. Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neurosci Lett.* 29, 111-5.
- Zhang, J., Abdallah, C. G., Wang, J., Wan, X., Liang, C., Jiang, L., Liu, Y., Huang, H., Hong, X., Huang, Q., Wu, R., Xu, C., 2012. Upregulation of adenosine A2A receptors induced by atypical antipsychotics and its correlation with sensory gating in schizophrenia patients. *Psychiatry Res.* 200, 126-32.
- Zhang, R. R., Cui, Q. Y., Murai, K., Lim, Y. C., Smith, Z. D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Y. K., Wu, H. P., Liu, W., Xu, Z. M., Yang, L., Ding, Y. Q., Tang, F., Meissner, A., Ding, C., Shi, Y., Xu, G. L., 2013. Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell.* 13, 237-45.
- Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L., Civelli, O., 1992. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 7432-6.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., Henikoff, S., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet.* 39, 61-9.

- Ziller, M. J., Muller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C. B., Bernstein, B. E., Lengauer, T., Gnirke, A., Meissner, A., 2011. Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet.* 7, e1002389.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R. J., Calne, D. B., Stoessl, A. J., Pfeiffer, R. F., Patenge, N., Carbajal, I. C., Vieregge, P., Asmus, F., Muller-Myhsok, B., Dickson, D. W., Meitinger, T., Strom, T. M., Wszolek, Z. K., Gasser, T., 2004. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 44, 601-7.
- Zoccolella, S., dell'Aquila, C., Abruzzese, G., Antonini, A., Bonuccelli, U., Canesi, M., Cristina, S., Marchese, R., Pacchetti, C., Zagaglia, R., Logroscino, G., Defazio, G., Lamberti, P., Livrea, P., 2009. Hyperhomocysteinemia in levodopa-treated patients with Parkinson's disease dementia. *Mov Disord.* 24, 1028-33.
- Zuccato, C., Cattaneo, E., 2009. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 5, 311-22.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Timmusk, T., Rigamonti, D., Cattaneo, E., 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nat Genet.* 35, 76-83.
- Zucchi, F. C., Yao, Y., Ward, I. D., Ilnytsky, Y., Olson, D. M., Benzie, K., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., Metz, G. A., 2013. Maternal stress induces epigenetic signatures of psychiatric and neurological diseases in the offspring. *PLoS One.* 8, e56967.