

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**MOLECULAR AND FUNCTIONAL INTERACTIONS BETWEEN
ADENOSINE AND DOPAMINE RECEPTORS. NEW
THERAPEUTIC TARGETS FOR THE TREATMENT OF
PARKINSON'S DISEASE**

Memòria presentada per la llicenciada en Bioquímica

MERITXELL CANALS BUJ

Per a optar al grau de Doctora en Bioquímica

Aquesta tesi s'ha inscrit dins del programa de doctorat de Biomedicina, bienni 1999-2001, de la Universitat de Barcelona. El treball experimental i la redacció de la present memòria han estat realitzats per Meritxell Canals Buj sota la direcció del Dr. Enric I. Canela Campos i de la Dra. Carme Lluís Biset

Dr. Enric I. Canela Campos

Dra. Carme Lluís Biset

Barcelona, Febrer del 2004

*A la Gisella, la Margarita
i el Ricard*

Sembla mentida però aquesta s'ha convertit en la part més difícil d'escriure. L'he deixat pel final de tot, evitant aquest sentiment d'enyorança que apareix tant bon punt pugues a un avió que t'allunya de casa teva, però ja és aquí, inevitable i es fa estrany, molt estrany....Tot i així, hi ha moltes persones que han contribuït a que el que semblava impossible esdevingui una realitat.

En primer lloc no estaria aquí si no fos per la confiança que van posar en mi dues persones, la Dra. Carme Lluís i el Dr. Rafael Franco. La Carme al llarg del temps s'ha convertit en molt més que una "jefa", hores i hores parlant, rient i discutint l'han convertit en una persona realment especial per mi. I el Rafa, qui m'ha donat grans oportunitats...recordo com si fos ahir quan en una reunió em va preguntar si volia anar a Canadà.... I el Dr. Enric Canela, també director d'aquesta tesi. Però el grup de Receptors no seria el que és sinó fos per la Pepi, sempre dedicada a escoltar-nos, a proposar solucions, a ajudar-nos.

Uns quants metres més enllà, al final del passadís, és on hi ha la maquinaria, Receptors, el laboratori. Amb el Vicent, amagat i silenciós, amb qui he pringat i rigut durant innumerables hores de pràctiques, el Paco, mestre, confident i assessor, el Javi, una joia, l'Ester, la Pauli, la Bàrbara, la Laia, el Rodrigo, la Nuria, el Víctor, l'Anna, el José Maria, la Carla, el Jordi, l'Assump, la Pepa, l'Iñaki....una colla de gent diferent que ha anat posant el seu granet de sorra i amb qui he passat molt bones estones.

Dins el departament hi he trobat també bons amics, el Joan, l'Antonio, la Ceci, la Sandra i la Sussana.... I que dir del Sr. Joan i el Sr. Manolo, dos sols enormes disposats a qualsevol cosa, arrencant un somriure en els moments més difícils, portant-me a esmorzar i pujant-me caixes de gel, simplement fantàstics.

En Michel Bouvier, l'Stéphanie i el Dimitri van fer que els mesos de Montréal fossin inoblidables, i en Kjell Fuxe, la Haleh i la Malin s'esforcen per a que les terres nòrdiques esdevinguin menys gèlides i més acollidores....

Hi ha dues estrelles que necessiten un lloc apartat, dues estrelles que, afortunadament per a mi, han brillat dins i fora del laboratori, el Dani i la Cris. Us enyoro tant! La Kriztie (amb el seu Pingu), hem passat tantes coses juntes... des de moments de bogeria absoluta, confidències, drames...gràcies per estirar-me la llengua tantes vegades i estar sempre al meu costat. I Dixie, què dir...hi havia dies que pensava que treballar tan junts no podia ser bo, la complementarietat perfecta dins el lab és el meu millor amic a fora, que més puc demanar! I ara què faig jo sola? Dono gràcies al cel (i a algú més concret) per haver-te fet venir de l'altre costat del món.

Però una tesi no només es fa dins el laboratori. Hi ha un grupet de gent que, sense adonar-se, m'han ajudat a tirar endavant. El Carles i el Jonathan m'han ajudat sempre a desconnectar, i a adonar-me que, sovint, em preocupo en excés sense motiu. La Mercè, des de Boston, durant hores de conferència telefònica, l'aliada que em fa veure les coses clares des de lluny i amb qui sempre puc comptar. La Mònica i la Míriam, hores i hores de cine, cafès, sopars, fins i tot viatges espontanis, sou genials.

I, finalment, el pilar més important del que sóc ara, la meva família, qui, sense entendre res sempre s'interessen pel que "realment faig al laboratori". Els Guerrero i els Peralta, per cuidar-me sempre tant i per fer dels moments que estem junts, records sempre divertits. L'avi Isidre i la iaia Paquita, que cada dimarts es preocupen pels experiments i em fan el sopar. La iaia Antonieta, sempre ella, forta i, per a mi, una persona admirable. La Carlota, la valentia i la força, i l'avi Ricardo, per fer-me la única capaç de fer-lo enfadar i oblidar-se'n als 5 minuts. I les tres persones, que també haurien de firmar aquesta tesi: la Gisel la (my little flower), la millor germana del món, la meva millor aliada, i el Ricard i la Margarita, els meus pares, per a qui no tinc paraules per agrair el que han fet per mi. Són tres sols sense els quals res seria possible i als que adoro amb bogeria.

A tots vosaltres, gràcies.

INDEX

ABBREVIATIONS	1
INTRODUCTION.....	3
G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS	5
<i>GPCR STRUCTURE AND FUNCTION.....</i>	5
<i>GPCR CLASSIFICATION</i>	9
<i>GPCR INTERACTING PROTEINS</i>	11
G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-RECEPTOR INTERACTIONS	13
<i>TECHNIQUES USED TO IDENTIFY GPCR DIMERS</i>	14
<i>FUNCTIONAL ROLE OF GPCR DIMERIZATION.....</i>	17
<i>ARCHITECTURE OF GPCR DIMERS.....</i>	20
DOPAMINE RECEPTORS	21
<i>STRUCTURE AND CLASSIFICATION</i>	21
<i>DOPAMINE D₂ RECEPTORS.....</i>	24
ADENOSINE RECEPTORS	26
<i>STRUCTURE AND CLASSIFICATION</i>	26
<i>PHYSIOLOGICAL ROLES OF ADENOSINE IN THE BRAIN</i>	28
<i>ADENOSINE A_{2A} RECEPTORS.....</i>	33
EVIDENCE OF INTERACTIONS BETWEEN ADENOSINE AND DOPAMINE RECEPTORS	34
<i>ADENOSINE AND DOPAMINE RECEPTORS INTERACTION IN PARKINSON DESEASE</i>	35
AIMS OF THIS STUDY.....	39
RESULTS.....	41
I-. Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A _{2A} receptor and dopamine D ₂ receptors”.....	45
II-. Adenosine A _{2A} - dopamine D ₂ receptor-receptor heteromerization. Qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer”.....	55
III-. “Homodimerization of adenosine A _{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer”.....	69
IV-. Molecular mechanisms involved in the adenosine A ₁ and A _{2A} receptor- induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures”.....	81
Contribution to other papers.....	117
SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION	119
CONCLUSIONS.....	133
ANNEX 1: Contribution to other papers	137
ANNEX 2: Reviews including results from this thesis	161
REFERENCES.....	205
RESUM EN CATALÀ.....	221

ABBREVIATIONS

AC	Adenylyl cyclase
ADA	Adenosine deaminase
A _n R	Adenosine A _n receptor
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin dependent protein kinase
cAMP	Adenosine 3',5'-cyclicmonophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CGS21680	2-p-(2-Carboxyethyl)-phenethylamino-5'-N-ethylcarboxamidoadenosine
CHO	Chinese hamster ovary
CREB	cAMP response element-binding
DARPP-32	Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa
DMSO	Dimethylsulfoxide
D _n R	Dopamine D _n receptors
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanine
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
ER	Endoplasmatic reticulum
ERK-1/2	Extracellular regulated kinase-1/2
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	γ-Aminobutyric acid
GF109203X	2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-3-(indol-3-yl)maleimide
GFP	Green fluorescent protein
GRK	G-protein coupled receptor kinase
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
H89	N-(2-[p-Bromocinnamyamino]ethyl)-5-isoquinolinesulfoamide
MAPK	Mitogen-associated protein kinase
mGluR	Metabotropic glutamate receptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MPTP	N-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NAD ⁺	Oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide
NGF	Nerve growth factor
PD98059	2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4-H-1-benzopyran-4-one
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidene difluoride
Rluc	<i>Renilla</i> luciferase
R-PIA	R-phenylisopropyladenosine
RT-PCR	Retro-transcriptase polymerase chain reaction
SAM	S-adenosylmethionine
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
TRITC	Tetramethylrhodamine isothiocyanate
YFP	Yellow fluorescent protein

ZM241385

4-(2-[7-Amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]riazin-5-ylamino]ethyl)phenol

INTRODUCTION

