

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina Hrušovská**

**Adenosinergní signalizace: role v neuroproteksi a neurodegeneraci**

**Adenosine signaling: the role in neuroprotection and  
neurodegeneration**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2018

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odborné rady a pomoc při psaní této práce a dalším lidem, a to hlavně rodině, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2018

Podpis

## Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je popsat základní a nejdůležitější mechanismy působení adenosinergní signalizace, a to hlavně v centrální nervové soustavě, kde se purinový nukleosid adenosin uplatňuje jako významný neuromodulátor. K výraznému uvolňování adenosinu do extracelulárního prostředí dochází v některých patologických situacích. Adenosin působí skrze své čtyři receptory, které mají velmi různorodé funkce. Některé účinky jsou neuroprotektivní – ty jsou zprostředkované převážně inhibičním receptorem A<sub>1</sub>, který může snižovat excitotoxicitu, jiné mohou způsobovat i neurodegeneraci, což je převážně způsobeno zvýšenou aktivací A<sub>2A</sub> receptorů. K ovlivnění této signalizace může docházet různými způsoby, například inhibicí enzymů zajišťující vznik nebo zánik adenosinu, blokací jeho transportérů, vlivem agonistů a antagonistů adenosinu nebo inhibicí druhých posílů a různých proteinkináz, jejichž prostřednictvím adenosin ovlivňuje buněčné pochody. Důležité jsou také interakce adenosinových receptorů s dalšími typy receptorů v mozku. Adenosin a adenosinové receptory se mohou uplatnit při neurodegenerativních procesech. Detailní pochopení specifických účinků adenosinu by mohlo přinést velký pokrok v léčbě neurodegenerativních nemocí. V současné době probíhá intenzivní výzkum různých ligandů adenosinových receptorů, včetně kofeinu, protože tyto látky mají velký terapeutický potenciál.

**Klíčová slova:** adenosin, adenosinový receptor, adenosinový transportér, neuroprotektce, neurodegenerace

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis is to describe basic and the most important mechanisms of adenosine signaling, especially in the central nervous system, where the purine nucleoside adenosine plays important role like significant neuromodulator. Strong release of adenosine to extracellular space may occur under some pathological conditions. Adenosine works through his four receptors, which have very diverse functions. Some effects are neuroprotective – these are predominantly mediated through the inhibitory A1 receptor, which can reduce neurotoxicity, others may also induce neurodegeneration, mainly due to increased activation of A2A receptors. This signaling system can be diversely modulated, for example by inhibition of enzymes, which can provide adenosine formation or degradation, blocking its transporters, by agonists or adenosine antagonists, or by inhibition of second messengers and various protein kinases by which adenosine affects cellular processes. Interactions of adenosine receptors with other types of receptors in the brain are also important. Adenosine and adenosine receptors can participate in neurodegenerative processes. A detailed understanding of the specific effects of adenosine can bring great progress in the treatment of neurodegenerative diseases. At present, intensive research of various ligands of adenosine receptors, including caffeine, is underway because these substances have a great therapeutic potential.

**Key words:** adenosine, adenosine receptor, adenosine transporter, neuroprotection, neurodegeneration

## OBSAH

<b>Seznam zkratk</b> .....	6
<b>Úvod</b> .....	9
<b>1. Adenosin</b> .....	11
1.1. Vznik adenosinu .....	11
<b>2. Transportéry</b> .....	12
2.1. Ekvilibrační typ .....	13
2.2. Koncentrační typ .....	14
<b>3. Receptory</b> .....	15
3.1. Struktura adenosinových GPCRs .....	15
3.2. A1 .....	16
3.3. A2A .....	17
3.4. A2B .....	17
3.5. A3 .....	17
3.6. Interakce s dalšími receptory .....	18
3.7. Agonisté a antagonisté adenosinových receptorů .....	19
<b>4. Adenosinergní signalizace</b> .....	19
<b>5. Role adenosinergní signalizace v CNS</b> .....	21
5.1. Neuroprotektce .....	24
<b>6. Význam adenosinergní signalizace v neuroprotektci při neurodegenerativních procesech</b> .....	27
6.1. Parkinsonova choroba .....	28
6.2. Alzheimerova choroba .....	29
6.3. Huntingtonova choroba .....	30
6.4. Roztroušená skleróza .....	31
<b>Závěr</b> .....	33
<b>Seznam použité literatury</b> .....	34

## SEZNAM ZKRATEK

AC	Adenylátcykláza
AD	Alzheimerova choroba
ADA	Adenosindeamináza
ADP	Adenosindifosfát
AK	Adenosinkináza
AMP	Adenosinmonofosfát
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATP	Adenosintrifosfát
A $\beta$	Amyloid beta
BDNF	Mozkový neurotrofický faktor
cAMP	Cyklický 3',5'-adenosinmonofosfát
CD73 = 5'-NT	5'-nukleodidáza
CD39 = ENTPD1	Ektonukleosidtrifosfátdifosfohydroláza 1
c-fos	Transkripční faktor, protoonkogen
CHO buňky	Buňky z vaječníků čínského křečka
CNS	Centrální nervová soustava
CNT	Koncentrační nukleosidový transportér
DAG	Diacylglycerol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E1-3	Extracelulární smyčky GPCRs
ENT	Ekvilibrační nukleosidový transportér
ERK1/2	Extracelulárním signálem regulované kinázy 1/2
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GDP	Guanosindifosfát

GPCR	Receptor spřažený s G-proteinem
GTP	Guanosintrifosfát
HD	Huntingtonova choroba
I1-3	Intracelulární smyčky GPCRs
IMP	Inosinmonofosfát
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfát
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
MAPK	Mitogeny aktivovaná proteinkináza
MEK1	Kináza účastnící se aktivace MAPK signální dráhy
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NBMPR	6-[(4-nitrobenzyl)thio]-9-β-D-ribofuranosylpurin
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
Nuc	Nukleosidy
p21	Protoonkogen ovlivňující proliferaci a diferenciaci buňky
p38	Stresem aktivovaná proteinkináza
PD	Parkinsonova choroba
PDE	Fosfodiesteráza
PI3K	Fosfoinositol-3-kináza
PIP2	Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PLC β	Fosfolipáza C beta
Ras	GTPázy ze skupiny protoonkogenů
SAH	S-adenosyl-L-homocystein
SAHH	S-adenosyl-L-homocystein hydroláza
TM	Transmembránový helix
RS	Roztroušená skleróza

## Agonisté a antagonisté adenosinových receptorů

BAY60-6583	2-[6-amino-3,5-dikyano-4-[4-(cyklopropylmethoxy)fenyl]pyridin-2ylsulfanyl]acetamid
CGS15943	9-chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]chinazolin-5-amin
CGS21680	3-[4-[2-[[6-amino-9-[(2R,3R,4S,5S)-5-(ethylkarbamoyl)-3,4-dihydroxy-oxolan-2-yl]purin-2-yl]amino]ethyl]fenyl]propanová kyselina
CPA	N <sup>6</sup> -cyklopentyladenosin
CI-IB-MECA	2-chloro-N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-5'-N-methylkarboxamidoadenosin
DPCPX	8-cyklopentyl-1,3-dipropylxanthin
IB-MECA	N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)-5'-N-methylkarboxamidoadenosin
KW6002	Istradefylin
MRS5147	(1R,2R,3S,4R,5S)-4-(6-(3-bromobenzylamino)-2-chloro-9H-purin-9-yl)bicyklo[3.1.0]hexane -2,3-diol
NECA	5'-N-ethylkarboxamidoadenosin
PSB-603	8-(4-(4-(4-chlorofenyl)piperazide-1-sulfonyl)fenyl)-1-propylxanthin
R-PIA	N <sup>6</sup> -[(R)-fenylisopropyl]adenosin
SCH420814	Preladenant
SCH58261	7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-(4,3-e)-1,2,4-triazolo(1,5-c)pyrimidin
ZM241385	4-(2-(7-amino-2-(furan-2-yl)-[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazin-5-ylamino)ethyl)fenol

## Receptory

A1R, A2AR, A2BR, A3R	Adenosinové receptory typu 1, 2A, 2B a 3
D1R, D2R	Dopaminové receptory typu 1 a 2
mGlu1R, mGlu5R	Metabotropní glutamátové receptory typu 1 a 5
P1R, P2YR	Purinové receptory typu 1 a 2Y



## ÚVOD

Adenosin je purinový nukleosid, který může vznikat jak intracelulárně, tak extracelulárně a tento různý původ vzniku má také vliv na jeho pozdější signalizaci. Na jeho vzniku se podílí hlavně enzymy adenosinkináza a adenosindeamináza a také membránově vázaná ektoenzymová kaskáda. Koncentraci adenosinu uvnitř i vně buňky ovlivňují adenosinové transportéry, které mohou transportovat i další typy purinových i pyrimidinových nukleosidů. Tyto transportéry se dělí do dvou typů podle stylu přenosu – ekvilibrační typy využívající usnadněnou difuzi podle koncentračního spádu a koncentrační typy, které využívají symport se sodnými ionty směrem do buňky. Všechny tyto enzymy i transportéry a jejich inhibitory mohou ovlivňovat hladinu extracelulárního adenosinu, která je přísně regulována. K výraznému výlevu adenosinu dochází až v patologických situacích jako je hypoxie, nedostatek energie, ischemie atd.

Po výlevu z buňky se adenosin váže na své membránově vázané adenosinové receptory. Existují 4 typy těchto receptorů – inhibiční A1 a A3 a stimulační A2A a A2B, které mají různé funkce i distribuci po celém těle. Tyto receptory jsou spřažené s G-proteiny, tudíž prostřednictvím alfa i beta/gama podjednotky dále ovlivňují buněčnou signalizaci skrze různé enzymy, proteinkinázy nebo druhé posly – například prostřednictvím AC, PKA, PLC, MAPK, cAMP, nebo i  $Ca^{2+}$ . Na regulaci této signalizace se podílí různí selektivní i neselektivní agonisté a antagonisté adenosinových receptorů, kteří mají velmi specifické účinky a tyto molekuly jsou proto významným cílem terapeutických výzkumů. Velmi důležitým neselektivním antagonistou je kofein, který je testován v léčebných postupech potenciálně vhodných pro terapii různých degenerativních onemocněních.

Adenosinové receptory hrají významnou roli v CNS, kde se převážně vyskytují A1 a A2A typy těchto receptorů. I v mozku je ale jejich rozmístění různé (A1 převážně v hipokampu a A2A ve striatu), a proto se jejich účinky v různých oblastech mohou lišit. Tyto receptory mají neuromodulační účinky – presynapticky ovlivňují výlev neurotransmiterů a postsynapticky ovlivňují excitabilitu buněk. Mají různý vliv i na gliové buňky (na jejich funkci i jejich ochranu). Významná je také jejich interakce s dalšími typy receptorů účastníci se signalizace v mozku (například s dopaminovými nebo glutamátovými typy receptorů), skrze které se mohou významně podílet na neuroprotektci.

Ke zvýšené neuroprotekcí může docházet různými způsoby – například stabilizací membránového potenciálu prostřednictvím regulace iontových kanálů A1 receptory nebo třeba snížením patologické aktivity gliových buněk a snížením excitotoxicity glutamátu blokací receptorů A2A. Zároveň bylo zjištěno, že vlivem velmi vysokých hladin adenosinu v patologických situacích může docházet i k neurodegeneraci, a to převážně stimulačními účinky A2A receptorů, které mohou zvyšovat excitotoxicitu.

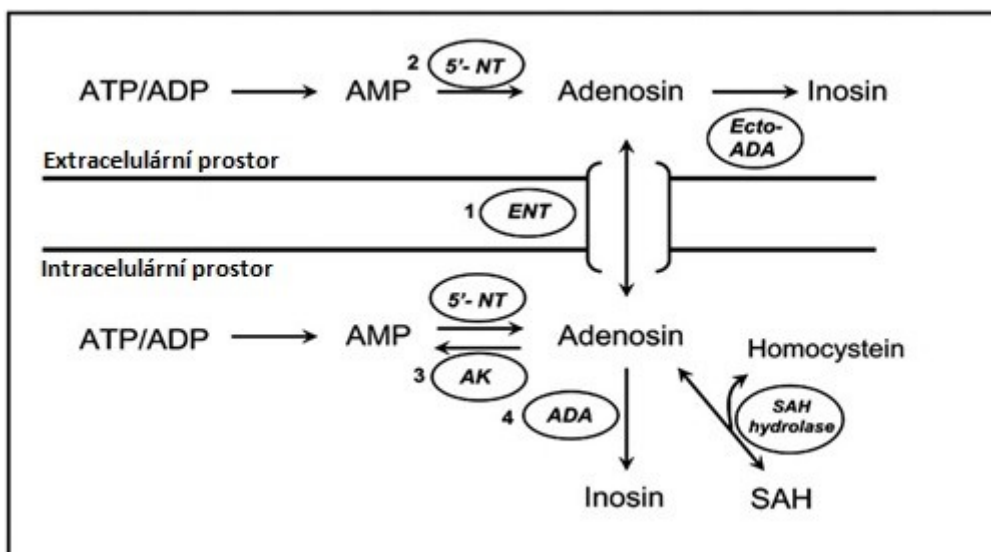
Adenosinergní signalizace je významný a dnes již velmi prozkoumaný systém, ale i přesto nejsou úplně všechny jeho schopnosti a účinky známy. Cílem této práce je přiblížit nejdůležitější funkce adenosinu a jeho receptorů v těle, a to hlavně v centrální nervové soustavě, kde může vykazovat neuroprotektivní, ale potenciálně také neurodegenerativní účinky. A také seznámit čtenáře s některými neurodegenerativními onemocněními (například Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba) a rolí adenosinu (nebo jeho antagonistů) a jeho receptorů ve zmírnění jejich průběhu nebo možné budoucí léčbě.

# 1. ADENOSIN

Adenosin je purinový nukleosid. Nachází se ve všech buňkách, kde plní různé funkce. Má funkci stavební (např. ATP, NADH a nukleové kyseliny), signální (váže se jako ligand na adenosinové receptory a v některých synapsích má i funkci neurotransmiteru) i regulační (působí na činnost srdce).

## 1.1. Vznik adenosinu

Adenosin je degradační produkt ATP. Za normálních i patologických podmínek (např. buněčný stres) určuje hladinu extracelulárního adenosinu uvolňování buněčného ATP a jeho následná hydrolýza na AMP a adenosin. Do extracelulárního prostoru je ATP uvolňován mnohem více právě při patologických situacích, což je například ischemie (nedokrevnost), následná hypoxie (nedostatečné zásobení kyslíkem) a nedostatek energie. Adenosin vzniká různými cestami – intracelulárně a poté je přenesen z buňky, nebo přímo extracelulárně (OBR. 1).



**OBR. 1: Obecné schéma metabolismu adenosinu.** 5'-NT: 5'-nukleotidáza; ADA: adenosindeamináza; AK: adenosinkináza; ENT: ekvilibrační nukleosidový transportér; SAH: S-adenosylhomocystein (převzato a upraveno podle Ramakers *et al.*, 2008)

V buňce je ATP hydrolyzován adenylátkinázou na ADP a AMP. Za normálních podmínek jsou tyto adeninové nukleotidy převážně refosforylovány zpět na ATP, nebo dochází k rozkladu

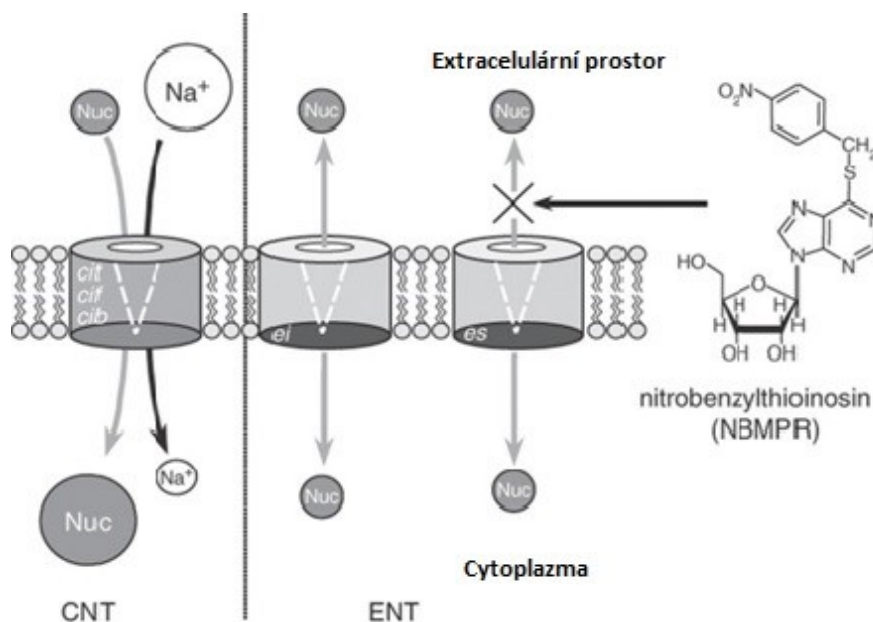
AMP, který je deaminován na IMP a ten je hydrolyzován na inosin a dále na hypoxantin. Pokud je koncentrace kyslíku v patologických hodnotách, dochází k rozkladu adenosinovou cestou (Barsotti and Ipata, 2004) – při ischemii a hypoxii dochází k velkému poklesu až nedostatku ATP a roste koncentrace ADP, což vyvolává aktivaci cytosolické AMP specifické 5'-nukleotidázy (Skladanowski and Newby, 1990), jejímž působením vzniká z AMP adenosin. Intracelulárně může adenosin vznikat také hydrolýzou S-adenosylhomocysteinu enzymem S-adenosylhomocysteinhydrolázou (Ueland, 1982).

Extracelulárně vzniká adenosin pomocí membránově vázaného ekto-enzymového kaskádového systému - přes protein CD39 (ENTPD1) a CD73 (5'-nukleotidáza) z ATP hydrolýzou až na adenosin (Zimmermann *et al.*, 2012).

Za normálních podmínek vzniká tedy jen malé množství adenosinu, který je převážně odbouráván fosforylací adenosinkinázou (AK) zpět na AMP. Při zvýšené tvorbě se na regulaci hladiny adenosinu podílí AK i ADA, jejíž prostřednictvím je adenosin deaminován adenosindeaminázou (ADA) na inosin a hypoxantin (Lloyd and Fredholm, 1995). Adenosin je poté transportován specifickými transportéry do extracelulárního prostoru, kde působí na membránově vázané adenosinové receptory.

## 2. TRANSPORTÉRY

Adenosin je hydrofilní molekula a pro svůj pohyb přes membránu buněk vyžaduje vlastní specializovaný transportní systém – nukleosidové transportéry (OBR. 2). Ty se dělí na dva typy podle způsobu přenosu. Ekvilibrační přenašeče využívají usnadněnou difuzi, tedy pasivní transport. Koncentrační přenašeče využívají transmembránový sodíkový gradient, tedy aktivní transport. Tento nukleosidový transportní systém také funguje například při vychytávání nukleosidů z lumen střeva, jejich příjmu v ledvinách a po syntéze v játrech při uvolňování a distribuci nukleosidů v různých tkáních celého těla. Účinek adenosinu mohou skrze tyto transportéry ovlivňovat různé inhibitory (Thorn and Jarvis, 1996).



**OBR. 2: Nukleosidový transportní systém.** CNT – koncentrační nukleosidový transportér; ENT – ekvilibrační nukleosidový transportér, Nuc - nukleosid (převzato a upraveno podle Young *et al.*, 2008)

## 2.1. Ekvilibrační typ

Ekvilibrační transportéry (ENTs) přenáší adenosin po jeho koncentračním gradientu – transport je obousměrný. Za normálních podmínek probíhá transport menšího množství adenosinu směrem do buňky, kde je degradován. Za patologických podmínek vzniká více adenosinu v buňce, tudíž je přenášen do extracelulárního prostoru. ENTs se dělí do dvou typů na základě citlivosti k inhibitoru nitrobenzylthioinosinu (NBMPR): es (equilibrative sensitive), které jsou inhibovány už nízkými hodnotami NBMPR kolem 0,1 – 10 nM a ei (equilibrative insensitive), které potřebují koncentraci až 1  $\mu$ M (Baldwin *et al.*, 1999). Tyto transportéry jsou ovlivňovány různými koncentracemi dalších inhibitorů jako například dipyridamol, dilazep a draflazin.

ENT proteiny patří do proteinové rodiny SLC29 a doposud byly objeveny čtyři (ENT1 – 4). Mají 11 transmembránových helixů s N-koncem v cytoplazmě a C-koncem v extracelulárním prostoru (Beal *et al.*, 2004). Nejlépe charakterizovaný ENT1 je typický es transportér a tudíž je velmi citlivý k NBMPR, zatímco druhý objevený ENT2 se řadí mezi ei, jelikož je k NBMPR i dalším inhibitorům (dipyridamol, dilazep, draflazin) téměř necitlivý (Griffiths *et al.*, 1997). ENT1 i ENT2 se nacházejí převážně na buněčném povrchu a jsou široce rozšířené ve většině

typech buněk i tkání. Dokáží transportovat všechny nukleosidy, navíc ENT2 přenáší i nukleobáze (Yao *et al.*, 1997). ENT3 patří mezi ei a dokáže transportovat všechny nukleosidy i nukleobáze. Také je široce rozšířen (mozek, tlusté střevo játra, plíce, slezina), ale nachází se převážně intracelulárně (hlavně na membránách lysozomů) a pro svou optimální aktivitu vyžaduje kyselé pH kolem 5.5 (Baldwin *et al.*, 2005). Poslední objevený ENT4 (Acimovic and Coe, 2002) je také ei typ. Nachází se na buněčném povrchu, vyskytuje se v různých tkáních (např. mozku a tenkém střevě), ale převážně v srdci. Transportuje hlavně monoaminy a organické kationty a pro přenos adenosinu je nejvíce aktivní také za kyselého pH (5.5 – 6.5) (Barnes *et al.*, 2006).

## 2.2. Koncentrační typ

Koncentrační transportéry (CNTs) využívají transmembránový gradient sodných iontů, jejichž koncentrace je mnohem větší v extracelulárním prostředí. Jedná se tedy o aktivní transport – symport nukleosidů se sodnými ionty směrem do buňky proti koncentračnímu spádu.

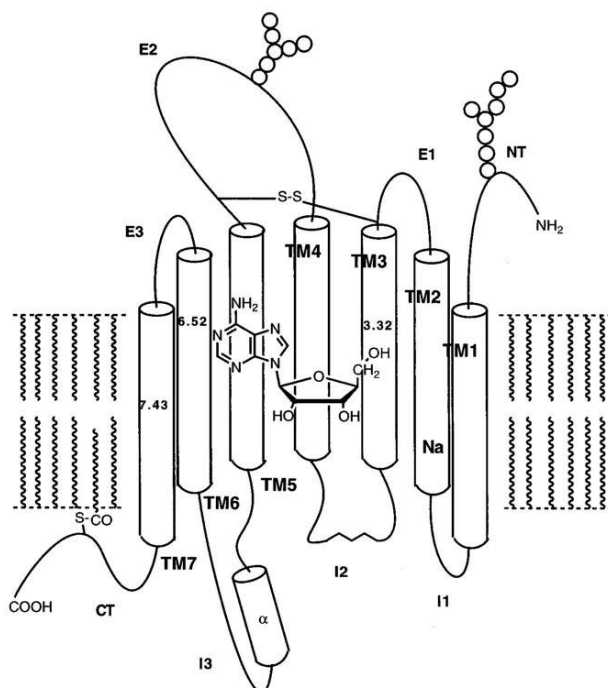
CNT proteiny patří do proteinové rodiny SLC28, které se dělí do tří podtypů – CNT1-3, které mohou být označovány i podle substrátové specifity cit, cif a cib. CNT1 (charakterizované např. u lidí v ledvinách (Ritzel *et al.*, 1997)) transportují pyrimidinové nukleosidy, takže patří mezi cit, zároveň ale přenáší i adenosin (Vijayalakshmi and Belt, 1988). CNT2 transportéry (charakterizované např. u lidí také v ledvinách (Wang *et al.*, 1997) nebo v tenkém střevě (Ritzel *et al.*, 1998)) se řadí mezi cif, což znamená, že přenáší purinové nukleosidy, ale i uridin (Vijayalakshmi and Belt, 1988) a CNT3 (charakterizované např. u lidí nebo myši (Ritzel *et al.*, 2001)) jsou transportéry cib, takže přenáší jak pyrimidiny, tak puriny (Wu *et al.*, 1992). Tvoří je 13 transmembránových helixů a N-konec se stejně jako u ENTs nachází v cytoplazmě a C-konec vně buňky (Hamilton *et al.*, 2001). CNT1 se nachází primárně na apikálních membránách epitelových buněk tenkého střeva, jater a ledvin – má tedy hlavní význam v transepiteliálním přenosu nukleosidů, CNT2 je široce rozšířený a vyskytuje se např. v srdci, mozku, játrech, slinivce a ve střevech, CNT3 se nachází např. ve slinivce, průdušnici, kostní dřeni, varlatech a játrech (Gray *et al.*, 2004).

### 3. RECEPTORY

Adenosin se jakožto signální molekula váže na purinergní receptory, původně označované hromadně jako P1 receptory. Později byly objeveny čtyři podtypy P1 receptorů na základě rozdílné struktury a farmakologických kritérií (Fredholm *et al.*, 1994). Pomocí molekulárního klonování byl klasifikován receptor A1 (Libert *et al.*, 1991), A2A (Maenhaut *et al.*, 1990), A2B (Rivkees and Reppert, 1992) a nakonec i A3 (Zhou *et al.*, 1992). Tyto receptory mají různé rozmístění i četnost výskytu. Také se odlišují svou afinitou k adenosinu – vysokou afinitu vykazují A1, A2A a A3 receptory a nízkou afinitu má receptor A2B. Všechny čtyři podtypy jsou membránově vázané receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) (Klinger *et al.*, 2002).

#### 3.1. Struktura adenosinových GPCRs

Všechny čtyři adenosinové receptory patří do rhodopsinové rodiny GPCRs, takže mají společnou obecnou strukturu (OBR. 3) – 7 transmembránových helixů s N-koncem v extracelulárním prostoru a C-koncem uvnitř buňky (Baldwin *et al.*, 1997).



**OBR. 3: Obecná struktura GPCRs rhodopsinového typu s navázaným adenosinem:** 7 transmembránových helixů (TM1-7), 3 extracelulární smyčky (E1-3), 3 intracelulární smyčky (I1-3), C-konec v cytosolu a N-konec v extracelulárním prostoru. I3: třetí intracelulární smyčka interaguje s alfa podjednotkou G-proteinu (převzato z Jiang *et al.*, 1997)

Tyto receptory interagují s trimerními G-proteiny, které mají tři podjednotky – alfa, beta a gama. Receptory se váží na alfa podjednotku. Různé podtypy receptorů působí na různé třídy G alfa podjednotek a mají na ně různé účinky. G alfa podjednotky byly podle porovnání sekvencí rozděleny do 4 tříd – Gs, Gi, Gq a G<sub>12</sub> (Wilkie *et al.*, 1992). Do těchto tříd patří další typy alfa podjednotek podle jejich funkce a umístění (TAB. 1).

**TAB. 1: Klasifikace alfa podjednotek G-proteinů.** AC: adenylátcykláza; PDE: fosfodiesteráza; PLC: fosfolipáza C (převzato a upraveno podle Neer, 1995 a Morris and Malbon, 1999)

Třída	Typ	Rozšíření	Efektor	Funkce
Gs	Gα <sub>s</sub>	Široké	AC	Stimulace AC
	Gα <sub>olf</sub>	Mozek		
Gi	Gα <sub>i-1</sub> , Gα <sub>i-2</sub> , Gα <sub>i-3</sub>	Široké	AC, K <sup>+</sup>	Inhibice AC
	Gα <sub>oA</sub> , Gα <sub>oB</sub>	Mozek	K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>	Regulace iontových kanálů
	Gα <sub>t1</sub> , Gα <sub>t2</sub>	Sítnice	PDE	Aktivace PDE
	Gα <sub>z</sub>			
Gq	Gα <sub>q</sub> , Gα <sub>11</sub>	Široké	PLC-β	Aktivace PLC
	Gα <sub>15</sub> , Gα <sub>16</sub>	Hematopoetická linie		
	Gα <sub>14</sub>			
G12	Gα <sub>12</sub> , Gα <sub>13</sub>	Široké	Cl <sup>-</sup> kanál	Regulace iontových kanálů

### 3.2. A1 receptory

A1 receptory interagují s Gi třídou alfa podjednotek, tudíž patří podle účinku na adenylátcyklázu mezi receptory inhibiční. Působí na Gα<sub>i</sub> a na Gα<sub>o</sub> podjednotky (Freissmuth *et al.*, 1991). Skrze Gα<sub>o</sub> dokáží regulovat některé iontové kanály, může docházet např. k aktivaci některých typů draslíkových kanálů nebo inaktivaci různých typů kalciových kanálů (Greene and Haas, 1991). Tyto receptory jsou nejhojněji rozšířené, a to převážně v mozku (hlavně v kůře, mozečku a hipokampu), nadledvinách a srdeční síni. Ve větší míře se nacházejí také v kosterním svalstvu, játrech, ledvinách, tlustém střevě, jícnu nebo i ve varlatech a tukové tkáni (Fredholm *et al.*, 2000).



### 3.3. A2A receptory

A2A receptory působí na Gs třídu alfa podjednotek G-proteinů, přičemž rozpoznávají oba typy těchto AC stimulujících podjednotek –  $G\alpha_s$  i  $G\alpha_{olf}$  (Kull *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že interagují také s Gq třídou, konkrétně s  $G\alpha_{15}$  a  $G\alpha_{16}$ , tudíž jejich prostřednictvím dokáží aktivovat fosfolipázu C (Offermanns and Simon, 1995). Nejvíce jsou rozšířeny v mozku, a to především ve striatu – na striatopallidárních GABAerních neuronech (Schiffmann *et al.*, 1991), bazálních gangliích a čichovém laloku. Dále je můžeme najít také v krevních destičkách, leukocytech, slezině a brzlíku. Méně pak v srdci, cévách, plicích a dalších oblastech mozku (Meng *et al.*, 1994; Fredholm *et al.*, 2000).

### 3.4. A2B receptory

Tyto receptory se řadí mezi stimulační typ, neboť skrze Gs třídu alfa podjednotek adenylátcyklázu aktivují. Zároveň interagují s alfa podjednotkami třídy Gq/11, čímž aktivují fosfolipázu C (Linden *et al.*, 1999). Tyto receptory jsou nejméně citlivé a jsou široce rozšířeny v různých tkáních, ale v menších množstvích. Byly nalezeny nejvíce exprimovány v tlustém a slepém střevě a močovém měchýři, méně v plicích, oku, žaludku a kosterním svalstvu a nejméně pak v srdci, ledvinách a játrech (Dixon *et al.*, 1996; Fredholm *et al.*, 2000).

### 3.5. A3 receptory

A3 receptory se vzhledem k tlumení účinku adenylátcyklázy řadí spolu s A1 a A2A receptory mezi inhibiční. Interagují s Gi a Gq typy alfa podjednotky G-proteinů, konkrétně s  $G\alpha_{i-2}$ ,  $G\alpha_{i-3}$  a s  $G\alpha_{q11}$ , skrze kterou aktivují fosfolipázu C (Palmer *et al.*, 1995). Tyto receptory mají omezenější rozšíření, liší se mírou výskytu v různých tkáních i u různých druhů. Nejvíce exprimovány jsou v potkaních varlatech (v lidských málo) a žírných buňkách, méně pak v plicích, ledvinách a srdci a nalezeny byly také v některých částech CNS (Zhou *et al.*, 1992).

### 3.6. Interakce s dalšími receptory

Některé receptory spřažené s G proteiny mohou existovat také jako heteromery – párují s dalšími typy receptorů a navzájem se mohou ovlivňovat (Fuxe *et al.*, 1983). Ve striatu bazálních ganglií hojně dochází k interakci adenosinového A2 a dopaminového D2 receptoru, které mají vůči sobě navzájem antagonistický účinek a tím mohou ovlivňovat dopaminergní aktivitu – stimulací A2 receptorů dochází ke snižování afinity D2 receptorů (Ferre *et al.*, 1991; Kamiya *et al.*, 2003). Ve striatu dochází také k interakci mezi receptorem A2A a metabotropním glutamátovým receptorem typu 5 (mGlu5R), které na sebe působí synergisticky (Ferré *et al.*, 2002). A1 receptory vytváří hlavně v mozečku a primárních kortikálních neuronech funkční komplexy s metabotropním glutamátovým receptorem typu 1 (mGlu1R), tudíž mohou ovlivňovat glutamátovou excitaci (Ciruela *et al.*, 2001). Dochází i k interakci mezi A1 a dopaminovým D1 receptorem, které na sebe působí antagonisticky (Ferré *et al.*, 1998; Ginés *et al.*, 2000). Další receptorovou interakcí je například tvorba heteromerů s P2Y typem purinergních receptorů (GPCRs, které mají selektivitu pro ATP), a to konkrétně A1R s P2Y<sub>1</sub>R, který stimuluje fosfolipázu C (Yoshioka *et al.*, 2001; Nakata *et al.*, 2005). Přestože A1R a A2AR mají opačná působení, byly objeveny heteromery i těchto receptorů, které se vyskytují převážně na glutamerních synapsích ve striatu, kde dokáží modulovat výlev glutamátu (Ciruela *et al.*, 2006). Také byla prokázána existence vyšších oligomerických komplexů A2AR/D2R/mGlu5 (Cabello *et al.*, 2009).

Interakce adenosinových receptorů s ostatními receptory a tvorba heteromerů je významná v kontextu zkoumání neurodegenerativních onemocnění a nových postupů potenciálně vhodných pro jejich terapii, jelikož agonisté a antagonisté adenosinu (z nichž je nejvýznamnějším antagonistou kofein) výrazně ovlivňují účinky signalizace dalších receptorů zvláště při neuromodulaci. Například dysfunkce dopaminových receptorů se podílí na Parkinsonově chorobě a dysfunkce glutamátových receptorů na Alzheimerově chorobě.

### 3.7. Agonisté a antagonisté adenosinových receptorů

Je známa celá řada ligandů, které se také váží na adenosinové receptory a mohou je různě ovlivňovat. Agonisté po navázání dokáží vyvolat fyziologickou odpověď odpovídající funkci receptoru. Převážná většina agonistů jsou deriváty purinů – analogy adenosinu nebo xantinu, které mají podobnou strukturu, ale oproti adenosinu mají mnohem delší účinek působení. Neselektivní agonista adenosinu je NECA (Müller and Jacobson, 2011). Nejčastější modifikace jsou substituce na N<sup>6</sup>, C<sub>2</sub> a C<sub>8</sub> a 5' pozici v molekule adenosinu. Například pro A1 receptor byly objeveny selektivní agonisté R-PIA nebo CPA. Pro A2A CGS21680 nebo například regadenoson, který byl testován pro své vazodilatační účinky. Pro A2B například aminopyridin BAY60-6583. Pro A3 jsou významnými agonisty IB-MECA nebo vysoce selektivní CI-IB-MECA (Müller and Jacobson, 2011).

Antagonisté po navázání odpověď receptoru nespouští, naopak mohou zabrat místo agonistickým ligandům, čímž vlastně funkci receptoru inhibují. Prototypičtí antagonisté byly původně alkylxantinové deriváty, které mají substituci na 1-, 3-, 7- a 8- pozici. Nyní se ale testují nové selektivnější látky, které obsahují i nepurinové heterocyklické struktury. Antagonistou pro A1 je například DPCPX. Pro A2A jsou významní selektivní antagonisté například triazolotriazin ZM241385, CGS15943, SCH58261 nebo istradefylin KW6002 a preladenant SCH420814, které se testují pro léčbu Parkinsonovy choroby. Pro A2B například PSB-603 a pro A3 MRS5147. Nejznámějšími neselektivními antagonisty jsou methylxantiny (přírodní látky vyskytující se v rostlinách), mezi které patří například kofein a teofylin (Müller and Jacobson, 2011).

Adenosinové receptory jsou široce rozšířeny, a proto je velmi žádoucí vyvíjet nové specifitější selektivní agonisty i antagonisty pro farmakoterapeutické účely, kteří dokáží cíleně působit na určité podtypy těchto receptorů v určitých lokalizacích.

## 4. ADENOSINERGNÍ SIGNALIZACE

Adenosinové receptory jsou široce exprimovány v téměř každém orgánu a každé tkáni, proto musí být hladina adenosinu v extracelulárním prostoru výrazně hlídána, jelikož je adenosin metabolicky velmi významný. Existuje vysoce efektivní systém pro jeho regulaci – buď

metabolickou degradací enzymy (AK, ADA), nebo zpětný přenos transportéry (ENTs) do buňky (Nguyen *et al.*, 2015). Za patologických podmínek (např. hypoxie, ischemie, zánět, nebo mechanické poškození buňky) je ale uvolňováno příliš velké množství adenosinu a regulační systém je inhibován, čímž dochází k jeho uvolňování do extracelulárního prostoru a působení na adenosinové receptory.

Po navázání ligandu (adenosinu nebo jeho agonistů) na receptor dochází ke konformační změně, což vede k interakci receptoru s alfa podjednotkou příslušného G-proteinu, která má na sobě v inaktivním stavu vázaný GDP. Pro aktivaci G-proteinu dojde k výměně GDP za GTP a k jeho disociaci na samostatnou alfa a dimerickou beta/gama podjednotku. Obě dále ovlivňují různé signální kaskády prostřednictvím druhých posílů (Gilman, 1987).

Mezi hlavními účinky adenosinu působícímu skrze G-proteiny patří ovlivňování hladiny cAMP v buňkách (Clark *et al.*, 1974; Calker *et al.*, 1979) skrze aktivaci adenylátcyklázy (AC). Působením na adenylátcyklázu dochází k její inhibici prostřednictvím  $G_i$  (A1 a A3 receptory), nebo k její stimulaci prostřednictvím  $G_s$  (A2 receptory) (Katada *et al.*, 1984). Vzniklé cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA), která dále fosforyluje další proteiny, enzymy a transkripční faktory a reguluje tak jejich funkci (Daniel *et al.*, 1998). Zároveň bylo zjištěno, že samotná stimulace AC způsobuje zvýšení extracelulárního adenosinu (prostřednictvím hydrolyzy cAMP vzniklého pomocí AC), což vede k aktivaci adenosinových receptorů (Pleli *et al.*, 2018).

Další enzym účastnící se adenosinové signalizace je fosfolipáza C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ), která je aktivovaná alfa podjednotkami  $G_q$  třídy G-proteinů, ale i  $\beta\gamma$  podjednotkou. PLC hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), ze kterého vznikají dva druhy posílů – inositol-1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol (DAG), které dále ovlivňují různé signální dráhy (Sternweis and Smrcka, 1993). IP<sub>3</sub> zvyšuje intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$  kationtů vyjitím z endoplazmatického retikula, které s pomocí DAG stimuluje proteinkinázu C. PLC  $\beta$  tedy vyvolává aktivaci PKC, která může ovlivňovat další buněčné signalizace včetně působení na MAPK prostřednictvím aktivace Ras, MEK a ERK1/2 (Schulte and Fredholm, 2003a).

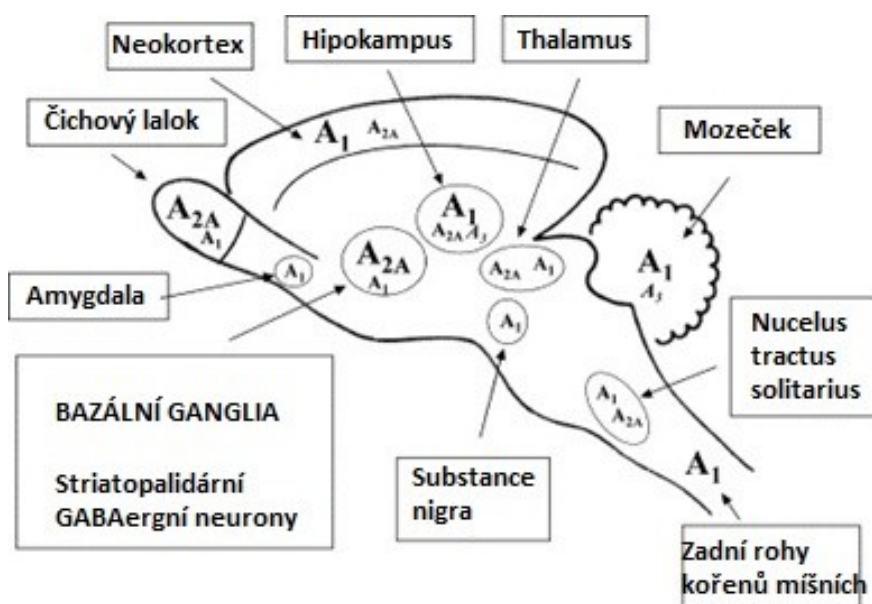
Skrze adenosin a podjednotky G-proteinů je také možné ovlivňovat mitogeny aktivované proteinkinázy (MAPK) a jejich prostřednictvím působit na buněčnou proliferaci a diferenciaci a regulovat buněčné přežití nebo smrt. Působení adenosinu na MAPK kinázovou kaskádu je zprostředkováno různými cestami a má různé odpovědi v různých buněčných typech. Všechny

4 typy adenosinových receptorů stimulují aktivaci ERK1/2 (Schulte and Fredholm, 2000). A1R (například v CHO buňkách) aktivují MAPK skrze aktivaci PI3K a MEK1 (Dickenson *et al.*, 1998). A2A receptory (například v lidských endoteliálních buňkách) stimulují MAPK skrze aktivaci p21<sup>RAS</sup> (protoonkogen ovlivňující proliferaci a diferenciaci buňky) (Sexl *et al.*, 1997). A2B receptory (v CHO buňkách) mohou stimulovat fosforylaci ERK1/2 i p38 (stresem aktivovaná proteinkináza) a to prostřednictvím G<sub>s</sub> podjednotky a cAMP, kdy pro aktivaci p38 je důležitá PKA a pro ERK1/2 PI3K (Schulte and Fredholm, 2003b). Signalizace skrze MAPK kaskádu vede k aktivaci mnoha transkripčních faktorů, které se podílejí na regulaci různých buněčných procesů. Abnormální stimulace této kaskády způsobená v patologických situacích (například výrazně zvýšenou signalizací prostřednictvím adenosinových receptorů) může vést k narušení buněčných pochodů nebo až k buněčnému poškození.

Adenosin hraje významnou roli v ochraně a obnově různých druhů tkání. Mezi hlavní mechanismy odpovědi pro regeneraci a protekci poškozených tkání vyvolané adenosinovými receptory patří zvýšení přívodu kyslíku vyvoláním vazodilatace, protizánětlivé efekty například zabráněním uvolňování prozánětlivých cytokinů a kyslíkových radikálů, ischemický preconditioning na ochranu srdeční tkáně a stimulace angiogeneze (novotvorba a remodelace krevních kapilár) (Linden, 2005). Adenosin je také významný neuromodulátor, který v CNS ovlivňuje spoustu funkcí a má navíc neuroprotektivní účinky.

## 5. ROLE ADENOSINERNÍ SIGNALIZACE V CNS

Adenosinové receptory mají neuromodulační účinek, který je jak presynaptický – adenosin ovlivňuje výlev neurotransmiterů, tak i postsynaptický – dochází k ovlivňování buněčné excitability prostřednictvím iontových kanálů. Adenosin moduluje synaptický přenos skrze inhibiční A1 a stimulační A2A receptory, které se v mozku vyskytují převážně, a to hlavně v hipokampu (A1R) a striatu (A2AR) (Cunha, 2001). Další výskyt adenosinových receptorů v mozku je například u A1R v kůře, mozečku a v zadních rozích kořenů míšních a u A2AR ve striatopalidárních GABAerních neuronech a čichovém laloku (OBR. 4) (Ribeiro *et al.*, 2002).



**OBR. 4:** Základní rozmístění vysokoafinitních receptorů A1, A2 a A3 v hlavních oblastech CNS (převzato a upraveno podle Ribeiro *et al.*, 2002)

Oba opačně působící adenosinové receptory jsou paradoxně přítomny na stejných nervových zakončeních. Bylo zjištěno, že při nižších koncentracích se adenosin přednostně váže na A1 receptory (mají k němu vyšší afinitu) a dochází tak k inhibičním účinkům na výlev neurotransmiterů, avšak pokud hladina adenosinu výrazně patologicky stoupne, váže se také na A2A receptory a převládá účinek stimulační (Correia-de-Sá *et al.*, 1996). Také bylo vyzorováno, že záleží i na zdroji, odkud adenosin pochází. Adenosin vytvořený extracelulárně rozkladem zvýšené hladiny uvolněných nukleotidů se preferenčně váže na A2A receptory a adenosin uvolněný přímo z buňky upřednostňuje receptory A1 (Cunha *et al.*, 1996). To, jaká akce nastane, jestli inhibiční nebo stimulační, záleží také na hustotě rozmístění receptorů a jejich množství v dané tkáni.

Presynapticky obecně prostřednictvím A1R dochází k inhibici výlevu excitačních neurotransmiterů (Yoon and Rothman, 1991), jako je acetylcholin (Brown *et al.*, 1990), aspartát a glutamát (Simpson *et al.*, 1992). A A2A receptory například dokáží stimulovat výlev glutamátu (Simpson *et al.*, 1992) a acetylcholinu (Brown *et al.*, 1990) nebo ve striatu modulovat výlev GABA (Kirk and Richardson, 1994).

Postsynapticky ovlivňuje adenosin excitabilitu buněk působením na iontové kanály skrze A1 receptory. Inhibicí N, P a Q typů kalciových napěťově ovládaných kanálů je snížen vtok  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů do buňky (Dolphin *et al.*, 1986; Ambrósio *et al.*, 1997). A aktivací draslíkových kanálů je zvýšen výlev  $\text{K}^+$  kationtů do extracelulárního prostředí, čímž dochází k hyperpolarizaci postsynaptických neuronů a stabilizaci membránového potenciálu (Trussell and Jackson, 1985).

Adenosin má také vztah s gliovými buňkami, které samy o sobě slouží jako podpora a ochrana neuronů. Astrocyty například udržují iontovou homeostázu a pH, chrání před excitotoxicitou, vychytávají škodlivé radikály a uvolněné neurotransmitery (hlavně glutamát) nebo vyživují neurony a podporují synaptogenezi, a tak se podílejí na ochraně nervových buněk před poškozením (Panickar and Norenberg, 2005). Za výrazných patologických podmínek (hypoxie, nedostatek energie) může docházet i k poškození a apoptóze nebo k abnormální aktivitě těchto gliových buněk, zároveň ale dochází ke zvýšení hladiny adenosinu. Bylo prokázáno, že v astrocytech se nacházejí všechny 4 typy adenosinových receptorů, ale výrazný vliv na jejich ochraně při hypoxii mají hlavně inhibiční receptory A1 a A3 (Björklund *et al.*, 2008). Pomocí astrocytů dochází k ovlivňování hladiny extracelulárního adenosinu, a to například prostřednictvím astrocytární AK (Boison *et al.*, 2010). Aktivace astrocytárních A2A receptorů také vede ke zvýšení hladiny extracelulárního glutamátu, čímž dochází k ovlivnění synaptické plasticity a zvýšenou aktivací těchto A2AR může docházet k excitotoxicitě (Li *et al.*, 2001). Tyto receptory však mají na gliové buňky mnoho dalších účinků, které jsou důležité například pro modulaci neuronální aktivity, ovlivňování hladiny adenosinu nebo pro kontrolu excitotoxicity a buněčné smrti (Boison *et al.*, 2010).

Adenosin uplatňuje v CNS vliv také prostřednictvím interakcí s dalšími receptory. Například prostřednictvím A1R/P2Y<sub>1</sub>R hetromerů, na které dokáže působit jak adenosin, tak i ATP, dochází k zeslabování výlevu neurotransmiterů (Nakata *et al.*, 2005). Heteromery A1/A2A ve striatu modulují výlev glutamátu – za nižších koncentrací se adenosin váže přednostně na A1R, čímž je transmise glutamátu inhibována, při větších výlevech působí adenosin i na A2AR, který utlumí účinek A1R a dochází k uvolňování glutamátu, což znamená, že aktivace A2AR v těchto komplexech snižuje afinitu A1R. V těchto heteromerech se zároveň snižuje afinita A2AR pro kofein (Ciruela *et al.*, 2006). Synergistická interakce mezi A2AR a glutamátovým mGlu5R vede ke zvýšení MAPKinázové aktivity, a to například zvýšením exprese genu c-fos, tudíž se podílí

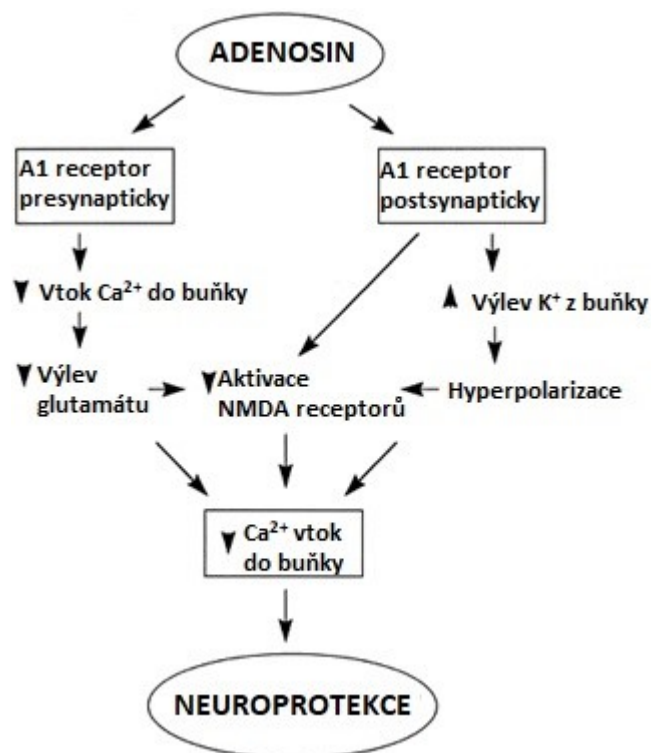
na regulaci buněčné proliferace a diferenciaci (Ferré *et al.*, 2002). Oligomery A1R/mGlu1R dokáží předcházet glutamátové excitotoxicitě. Spárované A2AR/D2R, nacházející se převážně na striatopallidárních GABAerních neuronech ve striatu, mají, stejně jako A1R/D1R, které se nacházejí také ve striatu, ale spíše na striatonigrálních GABAerních neuronech, vzájemně antagonistické účinky. Aktivace A2A receptoru vede ke snížení citlivosti D2R vůči dopaminu a tím ke snížení signalizace skrze D2R, což stimuluje AC. Blokadí A2A antagonisty tedy dochází ke zvýšení dopaminergní signalizace (Ciruela *et al.*, 2011).

### 5.1. Neuroprotektce

Při patologických procesech, jako je ischemie, následná hypoxie a nedostatek energie, dochází k okamžitému nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin – hlavně glutamátu. Jeho vysoké hladiny vedou k excitotoxicitě, a to prostřednictvím nadměrné aktivace ionotropních glutamátových receptorů NMDA (iontové kanály přenášející kationty včetně  $\text{Ca}^{2+}$ ), nastává depolarizace a výrazně stoupá intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (které mohou poškodit mitochondrie a vyvolat apoptózu), což vede k buněčnému poškození nebo buněčné smrti (Manev *et al.*, 1989). Za těchto abnormálních situací, jak již bylo uvedeno, vzniká i větší množství adenosinu, který vykazuje neuroprotektivní účinky.

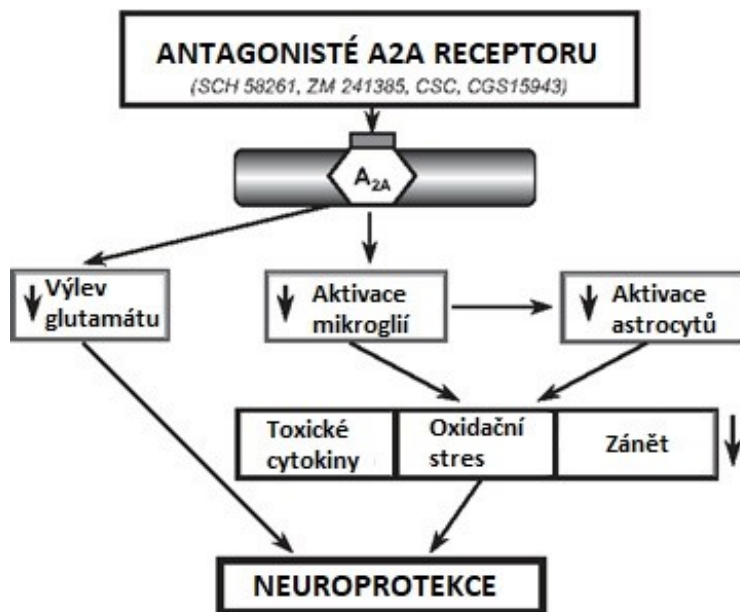
Stimulací A1 receptorů dochází k hyperpolarizaci prostřednictvím stimulace draslíkových kanálů a vtoku  $\text{K}^+$  iontů do buňky, čímž je předcházeno nadměrné depolarizaci (Haas and Greene, 1984). Tím se stabilizuje buněčný membránový potenciál a dochází ke snižování propustnosti napěťově závislých vápníkových kanálů – zmenšuje se vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do nervových buněk, čímž dochází k lepší ochraně před  $\text{Ca}^{2+}$  přetížením. Zároveň A1R přímo presynapticky inhibují kalciové iontové kanály, což způsobuje inhibici výlevu glutamátu (Poli *et al.*, 1993) a postsynapticky NMDA receptory (de Mendonça *et al.*, 1995), čímž je vtok  $\text{Ca}^{2+}$  také snižován a dochází k navození zvýšené neuroprotektce (OBR. 5).





**OBR. 5:** Schématické znázornění hlavních neuroprotektivních účinků A1 receptoru (převzato a upraveno podle de Mendonça *et al.*, 2000)

K neuroprotektivním účinkům dochází také prostřednictvím A2A receptorů, i když převážně jejich blokací (OBR. 6), protože antagonisté těchto excitačních receptorů zabraňují například uvolňování škodlivého množství glutamátu (Simpson *et al.*, 1992), který se podílí na excitotoxicitě a neuronálnímu poškození nebo, jak již bylo uvedeno, zvyšují hladinu dopaminu prostřednictvím stimulace dopaminových receptorů při neurodegenerativních poškozeních. Při patologických podmínkách dochází k abnormálnímu zvýšení aktivity a proliferace gliových buněk, například mikroglíí (Banati *et al.*, 1993) a astrocytů, což se projevuje oxidačním stresem, uvolňováním toxických cytokinů a vznikem zánětu, čímž může docházet k výraznému poškození nervových buněk. Toto může být inhibicí A2A receptorů potlačováno. Hlavní mechanismy neuroprotektive přímým působením A2A receptorů mohou být vazodilatace, inhibice agregace krevních destiček nebo potlačování zánětu (Wardas, 2002). A2AR může vykazovat neuroprotektivní účinky také skrze ovlivnění signální dráhy mozkového neurotrofického faktoru BDNF (protein podněcující například přežívání a růst nervových buněk a synapsí) – jeho prostřednictvím dochází k zesílení účinku této dráhy zvýšením aktivace neurotrofických receptorů, a tím ke zvýšení neuronálního přežití (Lee and Chao, 2001).



**OBR. 6:** Hlavní mechanismy neuroprotektce skrze blokaci A2A receptorů některými antagonisty (převzato a upraveno podle Wardas, 2002)

A2B a A3 receptory nejsou v mozku příliš rozšířeny, přesto také jejich prostřednictvím může k neuroprotektivním účinkům docházet, i když mechanismy jejich působení nejsou úplně známé. Například prostřednictvím A3 receptorů při ischemii dochází ke snížení poškození mozku souvisejícího s mozkovou mrtvicí a ke zlepšení lokomoční aktivity postiženého organismu a aktivace těchto receptorů může potlačovat apoptózu (Chen *et al.*, 2006). A3R se také stávají cílem výzkumů, které se zaměřují na vývoj léčby chronické neuropatické bolesti, jelikož agonisté A3 receptorů mohou tuto bolest kontrolovat a snižovat (Chen *et al.*, 2012).

Pro usnadnění zvýšení hladiny adenosinu v extracelulárním prostoru za ischemických a hypoxických podmínek, které je pro neuroprotektci nutné, mohou pro terapeutické účely sloužit inhibitory adenosindeaminázy a adenosinkinázy nebo blokátory adenosinových transportérů, které zabraňují absorpci adenosinu zpět do buňky k jeho degradaci (de Mendonça *et al.*, 2000). Další možné ovlivnění hladiny adenosinu může být i prostřednictvím inhibitorů enzymového systému ekto-nukleotidáz, který se podílí na vzniku adenosinu extracelulární cestou (který se přednostně váže na excitační A2A receptory). Pro farmakologické účely mohou mít tyto ligandy velký význam, a proto jsou jejich účinky v různých patologických situacích také zkoumány (Baqi, 2015).

Navzdory prokázanému neuroprotektivnímu účinku adenosinu bylo zjištěno, že za určitých podmínek může jeho vlivem docházet i k neurodegeneraci a neuronálnímu poškození. Působením příliš vysokých koncentrací adenosinu dochází převážně k aktivaci A2A receptorů, které, jak již bylo uvedeno, svými stimulačními účinky na výlev glutamátu a následným zvýšením hladiny  $Ca^{2+}$  mohou způsobovat poškození buněk (Popoli *et al.*, 1995). Zároveň dlouhodobým uvolňováním adenosinu a jeho prodlouženým účinkem na A1R může také docházet k neuronální smrti. Při ischemii a hypoxii dlouhodobá aktivace A1R vede ke snížení propustnosti  $Ca^{2+}$  snížením výskytu (internalizací pomocí endocytózy) AMPA receptorů (ionotropní glutamátové receptory zvyšující buněčnou excitabilitu) a k výraznému zvýšení synaptické deprivace, což vede k neuronálnímu poškození (Chen *et al.*, 2014). Poté navíc může docházet ke snížení citlivosti A1R a jejich internalizaci do buňky (Abbracchio *et al.*, 1992; Coelho *et al.*, 2006). Tím dochází ke zvýšení signalizace skrze excitační A2A receptory, a tím ke zvýšení výskytu  $Ca^{2+}$  propustných AMPA receptorů v nervových zakončeních (Chen *et al.*, 2014; Stockwell *et al.*, 2016). Takto dochází k excitotoxicitě vlivem zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$ , což může vést k degradaci buněk. Také bylo prokázáno, že prodlouženým účinkem adenosinu (za patologických podmínek) na astrocytární A2A receptory dochází k ovlivnění reabsorpce extracelulárního glutamátu – A2AR mohou snižovat aktivitu i expresi glutamátových transportérů na membránách astrocytů, čímž dochází ke zvyšování hladiny glutamátu v extracelulárním prostoru, což může ovlivňovat synaptickou plasticitu i procesy spojené s neurodegenerací (Matos *et al.*, 2012).

Studium protektivního potenciálu adenosinu má nicméně stále větší význam a tento purinový nukleosid je cílem mnoha výzkumů zaměřených na pochopení všech jeho účinků, jelikož terapeutické využití má slibné výsledky zvláště v oblasti kardio- a neuroprotektce.

## **6. VÝZNAM ADENOSINERNÍ SIGNALIZACE V NEUROPROTEKCI PŘI NEURODEGENERATIVNÍCH PROCESECH**

Množství lidí s neurodegenerativními onemocněními stále roste a příčiny těchto onemocnění nejsou stále úplně jasné – mohou být ovlivněné opotřebením buněk vlivem stáří, ale i genetickými poškozeními nebo prostředím a životním stylem. V rámci výzkumu možných léčiv použitelných pro zmírnění příznaků a zpomalení průběhu těchto chorob jsou hledány a

testovány nové látky vykazující neuroprotektivní účinky. Adenosinové receptory v těchto výzkumech hrají významnou roli, jelikož jsou v nervové tkáni široce rozšířené a mají různé funkce a skrze jejich agregaci s ostatními důležitými receptory účastníky se signalizace v CNS mohou ovlivňovat většinu signálních drah této soustavy.

Cílem této kapitoly je představit některé nejznámější choroby spojené s poškozením a odumíráním nervových buněk a možné mechanismy působení adenosinových receptorů a jejich agonistů a antagonistů k ovlivnění průběhu těchto nemocí.

Nejvýznamnějším společným cílem výzkumů se stali antagonisté receptorů A2A. Byly zkoumány účinky různých typů těchto antagonistů v CNS za různých patologických situací. Například SCH58261 v kortexu při mozkové ischemii (Monopoli *et al.*, 1998), kofein ve striatu u PD (Chen *et al.*, 2001), KW6002 v dopaminerních neuronech u PD (Ikeda *et al.*, 2002), kofein v hipokampu u AD (Arendash *et al.*, 2006), ZM241385 v nigrostriatálních dopaminových neuronech (Fathalla *et al.*, 2017). U všech těchto a mnoha dalších studií výsledky prokázaly neuroprotektivní účinky těchto látek nebo zlepšení motorických funkcí prostřednictvím inhibice A2A receptorů. Také bylo prokázáno, že významný podíl na funkci A2A receptorů má enzym ekto-5'-nukleotidáza (protein CD73, který je součástí ekto-enzymové kaskády při tvorbě adenosinu přímo vně buňky), který se společně s nimi hojně vyskytuje ve striatu a ovlivňuje tak jejich funkci – zvyšuje hladinu extracelulárního adenosinu, který se přednostně váže na A2AR a tím je aktivuje (Augusto *et al.*, 2013), tudíž může být dalším cílem hledání možností inhibice tohoto enzymu pro snížení stimulace A2A receptorů, a tím také snížení pravděpodobnosti možné neurodegenerace.

## **6.1. Parkinsonova choroba**

Při této nemoci dochází ke ztrátě dopaminergních neuronů v substantii nigra a dopaminergní inervace ve striatu, což vede ke snížení produkce dopaminu. To má důsledky převážně v motorickém systému, který ovlivňuje pohyb. Tudíž hlavními příznaky této choroby jsou dystonie (mimovolné svalové stahy), nebo naopak svalová ztuhlost, problémy s chůzí, špatná rovnováha a další obtíže při pohybu. V pozdějších stádiích může docházet také k emočním a spánkovým problémům, depresi a nakonec i k demenci. Původní snaha o léčení nebo aspoň o zmírnění příznaků zahrnovala aminokyselinu L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin), ze které

dopamin může vznikat. V pokročilejších stadiích jsou ale její účinky méně efektivní, a proto je snaha vyvinout nové nedopaminové způsoby možností léčby tohoto neurodegenerativního onemocnění (Sveinbjornsdottir, 2016).

Významným cílem těchto výzkumů se stali, jak bylo uvedeno, antagonisté receptoru A2A. Při dlouhodobém užívání může L-DOPA vyvolávat dyskinezi (mimovolné pohyby), která je při léčbě PD nežádoucí. Bylo prokázáno, že antagonistickou inhibicí (například istradefylinem) A2A receptorů může docházet ke snížení nebo i úplnému odstranění těchto vedlejších účinků (Xiao *et al.*, 2006). Blokadí A2A receptorů ve striatu také dochází k antagonistickým účinkům na dopaminové D2 receptory (se kterými vytváří heteromery), které jsou jimi aktivovány, a tudíž dochází ke stimulaci dopaminergní signalizace (Hillion *et al.*, 2002), což pozitivně působí na motorickou aktivitu. Důležitým neselektivním antagonistou, který má vysokou afinitu pro A2A receptory je právě kofein. Bylo mnohokrát prokázáno, že tento antagonist a jeho zvýšený příjem mají pozitivní vliv při prevenci i léčbě této, ale i jiných neurodegenerativních nemocí (Kolahdouzan and Hamadeh, 2017). Také dochází k výzkumům nových možností cílení léčby při PD, které budou mít co nejmenší, nejlépe žádné, vedlejší účinky. Například aktuálně byly navrženy nové látky, které se dokáží svou molekulární strukturou vázat a tím i působit na oba, při této patologii, důležité receptory A2A a D2 (Shao *et al.*, 2018), a které mohou být využity při vývoji nových léčiv.

## **6.2. Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní porucha vyznačující se hlavně ztrátou paměti, změnou osobnosti a v chování jedince, zhoršeným rozpoznáváním nebo špatnou orientací v prostoru. Hlavní patologické změny vyvolané touto nemocí jsou synaptická poškození a ztráta neuronů, zánětlivé procesy a změny v buněčném cyklu. Mezi charakteristické příznaky doprovázející tuto chorobu patří formování a hromadění amyloidu beta (A $\beta$ ) v mozkové tkáni, čímž vznikají extracelulární neuritické plaky a hyperfosforylace tau proteinu v intracelulárních neurofibrilárních klucích (Kandimalla and Reddy, 2017). Tyto neurodegenerativní struktury mohou vyvolávat zánětlivé odpovědi a tím další poškození buněčných pochodů, které vedou k degeneraci neuronů.

Ukázalo se, že kofein může hrát důležitou roli v ochraně i proti Alzheimerově chorobě – jeho prostřednictvím dochází v mozku ke snižování neurotoxicity způsobené zvýšenou hladinou A $\beta$  a tím i k možnému snížení poškození kognitivních funkcí (Dall’Igna *et al.*, 2003; Arendash *et al.*, 2006). Bylo zjištěno, že blokací A2A receptorů (zvýšeným příjmem kofeinu) dochází k neuroprotekcí snižováním ztráty synapsí skrze ovlivnění MAPK dráhy, a to konkrétně inhibicí proteinu p38 (stresem aktivovaná proteinkináza, jehož abnormální aktivita může vést až k buněčné smrti) (Canas *et al.*, 2009). Tento protein je aktivován toxicitou amyloidu beta (Zhu *et al.*, 2005), a proto možnými terapeutickými cíli mohou být nejen inhibitory A2A receptorů, ale i inhibitory p38 proteinu. Bylo prokázáno, že při této nemoci je v prefrontálním kortexu zvýšené množství A1 i A2A receptorů (Albasanz *et al.*, 2008). Také bylo zjištěno, že v hipokampu je zvýšená exprese A1 receptorů v neurodegenerujících strukturách, které zvyšují produkci ne-amyloidogenní formy amyloidového prekurzorového proteinu (ze kterého nevhodným štěpením může vznikat A $\beta$ ), což chrání před vznikem nánosů A $\beta$ . Aktivace těchto receptorů skrze aktivaci ERK zprostředkovávají fosforylaci a translokaci tau proteinu do cytoskeletu, kde je méně náchylný k formování patologických struktur (Angulo *et al.*, 2003). Zároveň ale blokátory inhibičních A1 receptorů, včetně neselektivního antagonisty kofeinu, způsobují stimulaci výlevu acetylcholinu (Carter *et al.*, 1995), který podporuje psychostimulační efekt kofeinu. Tudíž zvýšený příjem kofeinu má také významný vliv na zlepšení kognitivních funkcí pacientů s touto nemocí (Rahman, 2009). Modulace adenosinergního systému v CNS tedy může zpomalovat vývoj i snižovat projev symptomů u této závažné nemoci.

### **6.3. Huntingtonova choroba**

Huntingtonova choroba (HD) je dědičné neurodegenerativní onemocnění mozku, které je charakterizováno progresivními motorickými (pohybovými), kognitivními (poznávacími) a psychiatrickými symptomy, jako jsou například mimovolné pohyby, zhoršení koordinace myšlenek nebo impulzivní chování. Hlavním příznakem je mutace proteinu huntingtin, jehož fragmenty se hromadí v neuronech převážně kortikálních (organizace myšlení) a striatálních (motorické funkce) oblastí a působí jejich dysfunkci nebo dokonce nekrózu (Nopoulos, 2016).

Současné léky však mají výrazné vedlejší účinky, tudíž je žádoucí zkoumat jiné šetrnější léčebné postupy.

I u této nemoci se ve výzkumech možné léčby mohou uplatnit antagonisté A2A receptorů. Bylo prokázáno, že inhibice A2AR v časných fázích HD například zesiluje reverzní učení a snižuje deficit pracovní (krátkodobé) paměti (Wei *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Blokace A2A receptorů také snižovala poškození neuronů (Fink *et al.*, 2004). Při této nemoci je v hipokampu zvýšená aktivita PKA (kterou může vyvolávat patologická zvýšená stimulace A2AR), která navozuje dysfunkce rozpoznávací a prostorové paměti (Giralt *et al.*, 2011). Blokace A2AR, ale zároveň i D2R, tedy v hipokampu normalizuje aktivitu PKA a následně může zlepšovat kognitivní funkce (Tyebji *et al.*, 2015). Při této nemoci dochází také například k dysregulaci mitochondrií, abnormální aktivitě gliových buněk, zesilování zánětů a k dysfunkci glutamátového systému – zvýšení exprese a citlivosti NMDA receptorů, nebo snížení zpětného vychytávání glutamátu gliovými buňkami (Blum *et al.*, 2018). Jak již bylo uvedeno, tyto patologické procesy mohou být ovlivňovány adenosinergní signalizací, která (jak bylo také uvedeno) má ale různé účinky skrze A1 a A2A receptory, tudíž tento systém pro možnost terapeutického využití adenosinu vyžaduje důkladnějšího prozkoumání.

#### **6.4. Roztroušená skleróza**

Roztroušená skleróza (RS) je autoimunitní neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k napadání a rozpadu myelinu (izolační hmota urychlující synaptický přenos mezi neurony, která zároveň chrání před špatným přenosem signálu). Příčiny mohou být genetické i vlivem infekcí nebo prostředí. Při této nemoci dochází prostřednictvím patologického působení imunitního systému k zánětlivým procesům a poškození axonů a gliových buněk a k následným strukturálním poškozením, což vede k nahrazení poškozených neuronů gliovými jizvami a následné neurodegeneraci. Tato choroba vykazuje různé fyzické a kognitivní poruchy a také dochází k záchvatům. Výzkumy léčby se převážně zaměřují například na snížení autoreaktivity imunitního systému nebo vstupu jeho buněk do mozku (Compston and Coles, 2002).

Adenosin dokáže u této nemoci ovlivňovat imunitní aktivitu a přežití neuronů. Při RS dochází ke zvyšování zánětů a nervového poškození vlivem patologické aktivace mikroglií a makrofágů.

Na makrofázích v mozku bylo prokázáno snížení exprese a aktivity adenosinových A1 receptorů, které by mohly jejich patologickou aktivitu snižovat (Johnston *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že snížení exprese A1 receptorů může vést ke zhoršení demyelinizace, zvýšení výskytu zánětů a prozánětlivých cytokinů, axonálnímu poškození a ztrátě nebo ke zvýšení aktivity mikroglíí a makrofágů a většímu výlevu cytotoxických faktorů (Tsutsui *et al.*, 2004). Zvýšení množství a větší aktivace A1 receptorů by tedy mohlo vést k potlačení vývoje této nemoci. K tomu může docházet i zvýšeným příjmem kofeinu, protože jeho prostřednictvím může docházet ke zvýšení exprese A1R a potlačení prozánětlivých a cytotoxických reakcí a zachování myelinového obalu (Tsutsui *et al.*, 2004).



## ZÁVĚR

Adenosinergní signalizace má dalekosáhlé schopnosti působení, které se v různých tkáních, za různých situací i u různých druhů projevují výrazně odlišně. Souvisí to s tím, že se adenosin váže na své 4 typy receptorů, které mohou mít různé, a dokonce i navzájem protichůdné účinky. Tudíž není lehké popsat jeho typické účinky a vzhledem k jeho velkému fyziologickému významu by tomuto purinovému nukleosidu měla být věnována pozornost. Jeho významné uplatnění, zvláště v neuroprotekcí centrální nervové soustavy, již bylo prokázáno, ale je dále nutné zjišťovat, jak konkrétně v jakých patologických situacích a různých tkáních dokáže působit, jelikož byly (zvláště při silném a dlouhodobém působení adenosinu za patologických podmínek) prokázány i účinky podporující neurodegeneraci. Hlavní protektivní účinky adenosinu v neurodegenerativních onemocněních sice byly popsány, ale pro vývoj nových možných léků je třeba ještě důkladnějšího pochopení specifických mechanismů působení adenosinu, které se mohou uplatňovat v určitých tkáních a buněčných typech. Toho by mohlo být docíleno mimo jiné zkoumáním vlivu různých typů adenosinových agonistů a antagonistů a vyvíjet nové typy těchto ligandů. Jedním z mnoha významných antagonistů je přirozeně se vyskytující methylxantin kofein, který je moderní lidskou populací obecně přijímán ve větších dávkách, a tudíž je v popředí zájmu výzkumů. Důležité je monitorovat účinky kofeinu v neuroprotekcí a neurodegenerativních procesech při jeho zvýšeném příjmu, což se v různých studiích již odehrává a některé účinky jsou již známé. Také další enzymy a proteiny, působící například při jeho vzniku nebo transportu, jsou možným cílem při ovlivňování adenosinergní signalizace.

Jelikož má adenosin a jím řízená signalizace velmi široké pole působnosti a různorodé účinky, bude potřeba provést ještě mnoho experimentů a specifických výzkumů, než se dosáhne plného porozumění tohoto složitého a podivuhodného systému, který poté bude moci efektivně sloužit cíleným terapeutickým účelům na poli medicíny.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abbracchio, M. P., Fogliatto, G., Paoletti, A. M., Rovati, G. E. and Cattabeni, F. (1992) 'Prolonged in vitro exposure of rat brain slices to adenosine analogues: Selective desensitization of adenosine A1 but not A2 receptors.' *European Journal of Pharmacology*, 227, 317–324.

Acimovic, Y. and Coe, I. R. (2002) 'Molecular Evolution of the Equilibrative Nucleoside Transporter Family: Identification of Novel Family Members in Prokaryotes and Eukaryotes.' *Molecular Biology and Evolution*, 19, 2199–2210.

Albasanz, J. L., Perez, S., Barrachina, M., Ferrer, I. and Martín, M. (2008) 'Up-regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease.' *Brain Pathology*, 18, 211–219.

Ambrósio, A. F., Malva, J. O., Carvalho, A. P. and Carvalho, C. M. (1997) 'Inhibition of N-,P/Q- and other types of Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A1 receptor.' *European Journal of Pharmacology*, 340, 301–10.

Angulo, E., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Viñals, F., Ferrer, I., Lluís, C. and Franco, R. (2003) 'A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation.' *Brain Pathology*, 13, 440–51.

Arendash, G. W., Schleif, W., Rezai-Zadeh, K., Jackson, E. K., Zacharia, L. C., Cracchiolo, J. R., Shippy, D. and Tan, J. (2006) 'Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive impairment and reduces brain  $\beta$ -amyloid production.' *Neuroscience*, 142, 941–952.

Augusto, E., Matos, M., Sévigny, J., El-Tayeb, A., Bynoe, M. S., Müller, C. E., Cunha, R. A. and Chen, J.-F. (2013) 'Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated formation of adenosine is critical for the striatal adenosine A2A receptor functions.' *Journal of Neuroscience*, 33, 11390–9.

Baldwin, J. M., Schertler, G. F. and Unger, V. M. (1997) 'An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors.' *Journal of Molecular Biology*, 272, 144–64.

Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E. and Young, J. D. (1999) 'Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development.' *Molecular Medicine Today*, 5, 216–224.

Baldwin, S. A., Yao, S. Y. M., Hyde, R. J., Ng, A. M. L., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M. W. L., Cass, C. E. and Young, J. D. (2005) 'Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes.' *Journal of Biological Chemistry*, 280, 15880–7.

Banati, R. B., Gehrmann, J., Schubert, P. and Kreutzberg, G. W. (1993) 'Cytotoxicity of microglia.' *Glia*, 7, 111–118.

Baqi, Y. (2015) 'Ecto-nucleotidase inhibitors: recent developments in drug discovery.' *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 15, 21–33.

Barnes, K., Dobrzynski, H., Foppolo, S., Beal, P. R., Ismat, F., Scullion, E. R., Sun, L., Tellez, J., Ritzel, M. W. L., Claycomb, W. C., Cass, C. E., Young, J. D., Billeter-Clark, R., Boyett, M. R. and Baldwin, S. A. (2006) 'Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH.' *Circulation Research*, 99, 510–9.

Barsotti, C. and Ipata, P. L. (2004) 'Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts.' *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 2214–2225.

Beal, P. R., Yao, S. Y. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., King, A. E. and Cass, C. E. (2004) 'The equilibrative

- nucleoside transporter family, SLC29.' *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447, 735–743.
- Björklund, O., Shang, M., Tonazzini, I., Daré, E. and Fredholm, B. B. (2008) 'Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage.' *European Journal of Pharmacology*, 596, 6–13.
- Blum, D., Chern, Y., Domenici, M. R., Buée, L., Lin, C.-Y., Rea, W., Ferré, S. and Popoli, P. (2018) 'The Role of Adenosine Tone and Adenosine Receptors in Huntington's Disease.' *Journal of Caffeine and Adenosine Research*, 8, 43–58.
- Boison, D., Chen, J.-F. and Fredholm, B. B. (2010) 'Adenosine signaling and function in glial cells.' *Cell Death & Differentiation*, 17, 1071–1082.
- Brown, S. J., James, S., Reddington, M. and Richardson, P. J. (1990) 'Both A1 and A2a purine receptors regulate striatal acetylcholine release.' *Journal of Neurochemistry*, 55, 31–8.
- Cabello, N., Gandía, J., Bertarelli, D. C. G., Watanabe, M., Lluís, C., Franco, R., Ferré, S., Luján, R. and Ciruela, F. (2009) 'Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells.' *Journal of Neurochemistry*, 109, 1497–507.
- Calker, D. van, Müller, M. and Hamprecht, B. (1979) 'Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells.' *Journal of Neurochemistry*, 33, 999–1005.
- Canas, P. M., Porciúncula, L. O., Cunha, G. M. A., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M. A., Oliveira, C. R. and Cunha, R. A. (2009) 'Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway.' *Journal of Neuroscience*, 29, 14741–51.
- Carter, A. J., O'Connor, W. T., Carter, M. J. and Ungerstedt, U. (1995) 'Caffeine enhances acetylcholine release in the hippocampus in vivo by a selective interaction with adenosine A1 receptors.' *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 637–42.
- Ciruela, F., Casadó, V., Rodrigues, R. J., Luján, R., Burgueño, J., Canals, M., Borycz, J., Rebola, N., Goldberg, S. R., Mallol, J., Cortés, A., Canela, E. I., López-Giménez, J. F., Milligan, G., Lluís, C., Cunha, R. A., Ferré, S. and Franco, R. (2006) 'Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers.' *Journal of Neuroscience*, 26, 2080–7.
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M. M., Canela, E. I., Mallol, J., Chan, W. Y., Lluís, C., McIlhinney, R. A. and Franco, R. (2001) 'Metabotropic glutamate 1alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes.' *Journal of Biological Chemistry*, 276, 18345–51.
- Ciruela, F., Gómez-Soler, M., Guidolin, D., Borroto-Escuela, D. O., Agnati, L. F., Fuxe, K. and Fernández-Dueñas, V. (2011) 'Adenosine receptor containing oligomers: their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain.' *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808, 1245–55.
- Clark, R. B., Gross, R., Su, Y. F. and Perkins, J. P. (1974) 'Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate content in human astrocytoma cells by adenosine and the adenine nucleotides.' *Journal of Biological Chemistry*, 249, 5296–303.
- Coelho, J. E., Rebola, N., Fragata, I., Ribeiro, J. A., de Mendonça, A. and Cunha, R. A. (2006) 'Hypoxia-induced desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in the rat hippocampus.' *Neuroscience*, 138, 1195–203.
- Compston, A. and Coles, A. (2002) 'Multiple sclerosis.' *The Lancet*, 359, 1221–1231.
- Correia-de-Sá, P., Timóteo, M. A. and Ribeiro, J. A. (1996) 'Presynaptic A1 inhibitory/A2A facilitatory adenosine receptor activation balance depends on motor nerve stimulation paradigm at the rat

hemidiaphragm.' *Journal of Neurophysiology*, 76, 3910–9.

Cunha, R. A. (2001) 'Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors.' *Neurochemistry International*, 38, 107–125.

Cunha, R. A., Correia-de-Sá, P., Sebastião, A. M. and Ribeiro, J. A. (1996) 'Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides.' *British Journal of Pharmacology*, 119, 253–60.

Dall'Igna, O. P., Porciúncula, L. O., Souza, D. O., Cunha, R. A., Lara, D. R. and Dall'Igna, O. P. (2003) 'Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity.' *British Journal of Pharmacology*, 138, 1207–9.

Daniel, P. B., Walker, W. H. and Habener, J. F. (1998) 'Cyclic AMP signaling and gene regulation.' *Annual Review of Nutrition*, 18, 353–83.

Dickenson, J. M., Blank, J. L. and Hill, S. J. (1998) 'Human adenosine A1 receptor and P2Y2-purinoceptor-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in transfected CHO cells.' *British Journal of Pharmacology*, 124, 1491–9.

Dixon, A. K., Gubitz, A. K., Sirinathsinghji, D. J., Richardson, P. J. and Freeman, T. C. (1996) 'Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat.' *British Journal of Pharmacology*, 118, 1461–8.

Dolphin, A. C., Forda, S. R. and Scott, R. H. (1986) 'Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue.' *Journal of Physiology*, 373, 47–61.

Fathalla, A. M., Soliman, A. M. and Moustafa, A. A. (2017) 'Selective A2A receptors blockade reduces degeneration of substantia nigra dopamine neurons in a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: A histological study.' *Neuroscience Letters*, 643, 89–96.

Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B. and Fuxe, K. (1991) 'Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7238–41.

Ferré, S., Karcz-Kubicha, M., Hope, B. T., Popoli, P., Burgueño, J., Gutiérrez, M. A., Casadó, V., Fuxe, K., Goldberg, S. R., Lluit, C., Franco, R. and Ciruela, F. (2002) 'Synergistic interaction between adenosine A2A and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11940–5.

Ferré, S., Torvinen, M., Antoniou, K., Irenius, E., Civelli, O., Arenas, E., Fredholm, B. B. and Fuxe, K. (1998) 'Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells.' *Journal of Biological Chemistry*, 273, 4718–24.

Fink, J. S., Kalda, A., Ryu, H., Stack, E. C., Schwarzschild, M. A., Chen, J.-F. and Ferrante, R. J. (2004) 'Genetic and pharmacological inactivation of the adenosine A2A receptor attenuates 3-nitropropionic acid-induced striatal damage.' *Journal of Neurochemistry*, 88, 538–44.

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P. and Williams, M. (1994) 'Nomenclature and classification of purinoceptors.' *Pharmacological Reviews*, 46, 143–56.

Fredholm, B. B., Arslan, G., Halldner, L., Kull, B., Schulte, G. and Wasserman, W. (2000) 'Structure and function of adenosine receptors and their genes.' *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362, 364–374.

Freissmuth, M., Schütz, W. and Linder, M. E. (1991) 'Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3.' *Journal of Biological*

*Chemistry*, 266, 17778–83.

Fuxe, K., Agnati, L. F., Benfenati, F., Celani, M., Zini, I., Zoli, M. and Mutt, V. (1983) 'Evidence for the existence of receptor--receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides.' *Journal of Neural Transmission*, 18, 165–79.

Gilman, A. G. (1987) 'G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals.' *Annual Review of Biochemistry*, 56, 615–649.

Ginés, S., Hillion, J., Torvinen, M., Le Crom, S., Casadó, V., Canela, E. I., Rondin, S., Lew, J. Y., Watson, S., Zoli, M., Agnati, L. F., Verniera, P., Lluís, C., Ferré, S., Fuxe, K. and Franco, R. (2000) 'Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8606–11.

Giralt, A., Saavedra, A., Carretón, O., Xifró, X., Alberch, J. and Pérez-Navarro, E. (2011) 'Increased PKA signaling disrupts recognition memory and spatial memory: role in Huntington's disease.' *Human Molecular Genetics*, 20, 4232–4247.

Gray, J. H., Owen, R. P. and Giacomini, K. M. (2004) 'The concentrative nucleoside transporter family, SLC28.' *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447, 728–734.

Greene, R. W. and Haas, H. L. (1991) 'The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system.' *Progress in Neurobiology*, 36, 329–41.

Griffiths, M., Yao, S. Y., Abidi, F., Phillips, S. E., Cass, C. E., Young, J. D. and Baldwin, S. A. (1997) 'Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta.' *Biochemical Journal*, 328 ( Pt 3, 739–43.

Haas, H. L. and Greene, R. W. (1984) 'Adenosine enhances afterhyperpolarization and accommodation in hippocampal pyramidal cells.' *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 402, 244–7.

Hamilton, S. R., Yao, S. Y., Ingram, J. C., Hadden, D. A., Ritzel, M. W., Gallagher, M. P., Henderson, P. J., Cass, C. E., Young, J. D. and Baldwin, S. A. (2001) 'Subcellular distribution and membrane topology of the mammalian concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter rCNT1.' *Journal of Biological Chemistry*, 276, 27981–8.

Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M., Casado, V., Scott, R., Terasmaa, A., Hansson, A., Watson, S., Olah, M. E., Mallol, J., Canela, E. I., Zoli, M., Agnati, L. F., Ibanez, C. F., Lluís, C., Franco, R., Ferre, S. and Fuxe, K. (2002) 'Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors.' *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18091–7.

Chen, G.-J., Harvey, B. K., Shen, H., Chou, J., Victor, A. and Wang, Y. (2006) 'Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents.' *Journal of Neuroscience Research*, 84, 1848–1855.

Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., Sonsalla, P. K., Castagnoli, K., Castagnoli, N. and Schwarzschild, M. A. (2001) 'Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease.' *Journal of Neuroscience*, 21, RC143.

Chen, Z., Janes, K., Chen, C., Doyle, T., Bryant, L., Tosh, D. K., Jacobson, K. A. and Salvemini, D. (2012) 'Controlling murine and rat chronic pain through A<sub>3</sub> adenosine receptor activation.' *The FASEB Journal*, 26, 1855–1865.

Chen, Z., Xiong, C., Pancyr, C., Stockwell, J., Walz, W. and Cayabyab, F. S. (2014) 'Prolonged adenosine A1 receptor activation in hypoxia and pial vessel disruption focal cortical ischemia facilitates clathrin-mediated AMPA receptor endocytosis and long-lasting synaptic inhibition in rat hippocampal CA3-CA1 synapses: differential regulation of GluA2 and GluA1 subunits by p38 MAPK and JNK.' *Journal of Neuroscience*, 34, 9621–43.

- Ikeda, K., Kurokawa, M., Aoyama, S. and Kuwana, Y. (2002) 'Neuroprotection by adenosine A2A receptor blockade in experimental models of Parkinson's disease.' *Journal of Neurochemistry*, 80, 262–70.
- Jiang, Q., Lee, B. X., Glashofer, M., van Rhee, A. M. and Jacobson, K. A. (1997) 'Mutagenesis reveals structure-activity parallels between human A2A adenosine receptors and biogenic amine G protein-coupled receptors.' *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 2588–95.
- Johnston, J. B., Silva, C., Gonzalez, G., Holden, J., Warren, K. G., Metz, L. M. and Power, C. (2001) 'Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis.' *Annals of Neurology*, 49, 650–658.
- Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. and Nakata, H. (2003) 'Oligomerization of adenosine A2A and dopamine D2 receptors in living cells.' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306, 544–9.
- Kandimalla, R. and Reddy, P. H. (2017) 'Therapeutics of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease.' *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 1049–1069.
- Katada, T., Northup, J. K., Bokoch, G. M., Ui, M. and Gilman, A. G. (1984) 'The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition.' *Journal of Biological Chemistry*, 259, 3578–85.
- Kirk, I. P. and Richardson, P. J. (1994) 'Adenosine A2a receptor-mediated modulation of striatal [3H]GABA and [3H]acetylcholine release.' *Journal of Neurochemistry*, 62, 960–6.
- Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002) 'Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins.' *Cellular Signalling*, 14, 99–108.
- Kolahdouzan, M. and Hamadeh, M. J. (2017) 'The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases.' *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23, 272–290.
- Kull, B., Svenningsson, P. and Fredholm, B. B. (2000) 'Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum.' *Molecular Pharmacology*, 58, 771–7.
- Lee, F. S. and Chao, M. V. (2001) 'Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins.' *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 3555–3560.
- Li, W., Silva, H. B., Real, J., Wang, Y.-M., Rial, D., Li, P., Payen, M.-P., Zhou, Y., Muller, C. E., Tomé, A. R., Cunha, R. A. and Chen, J.-F. (2015) 'Inactivation of adenosine A2A receptors reverses working memory deficits at early stages of Huntington's disease models.' *Neurobiology of Disease*, 79, 70–80.
- Li, X. X., Nomura, T., Aihara, H. and Nishizaki, T. (2001) 'Adenosine enhances glial glutamate efflux via A2a adenosine receptors.' *Life Sciences*, 68, 1343–50.
- Libert, F., Schiffmann, S. N., Lefort, A., Parmentier, M., Gérard, C., Dumont, J. E., Vanderhaeghen, J. J. and Vassart, G. (1991) 'The orphan receptor cDNA RDC7 encodes an A1 adenosine receptor.' *The EMBO Journal*, 10, 1677–82.
- Linden, J. (2005) 'Adenosine in tissue protection and tissue regeneration.' *Molecular Pharmacology*, 67, 1385–7.
- Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X. and Robeva, A. S. (1999) 'Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells.' *Molecular Pharmacology*, 56, 705–13.
- Lloyd, H. G. and Fredholm, B. B. (1995) 'Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices.' *Neurochemistry*

*International*, 26, 387–95.

Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaegen, J. J., Dumont, J. E., Vassart, G. and Schiffmann, S. (1990) 'RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity.' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 1169–78.

Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A. and Costa, E. (1989) 'Delayed increase of Ca<sup>2+</sup> influx elicited by glutamate: role in neuronal death.' *Molecular Pharmacology*, 36, 106–12.

Matos, M., Augusto, E., Santos-Rodrigues, A. Dos, Schwarzschild, M. A., Chen, J.-F., Cunha, R. A. and Agostinho, P. (2012) 'Adenosine A2A receptors modulate glutamate uptake in cultured astrocytes and gliosomes.' *Glia*, 60, 702–716.

de Mendonça, A., Sebastião, A. M. and Ribeiro, J. A. (1995) 'Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation.' *Neuroreport*, 6, 1097–100.

de Mendonça, A., Sebastião, A. M. and Ribeiro, J. A. (2000) 'Adenosine: does it have a neuroprotective role after all?' *Brain Research*, 33, 258–74.

Meng, F., Xie, G. X., Chalmers, D., Morgan, C., Watson, S. J. and Akil, H. (1994) 'Cloning and expression of the A2a adenosine receptor from guinea pig brain.' *Neurochemical Research*, 19, 613–21.

Monopoli, A., Lozza, G., Forlani, A., Mattavelli, A. and Ongini, E. (1998) 'Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats.' *Neuroreport*, 9, 3955–9.

Morris, A. J. and Malbon, C. C. (1999) 'Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling.' *Physiological Reviews*, 79, 1373–1430.

Müller, C. E. and Jacobson, K. A. (2011) 'Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs.' *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1808, 1290–1308.

Nakata, H., Yoshioka, K., Kamiya, T., Tsuga, H. and Oyanagi, K. (2005) 'Functions of Heteromeric Association Between Adenosine and P2Y Receptors.' *Journal of Molecular Neuroscience*, 26, 233–238.

Neer, E. J. (1995) 'Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals.' *Cell*, 80, 249–57.

Nguyen, M. D., Ross, A. E., Ryals, M., Lee, S. T. and Venton, B. J. (2015) 'Clearance of rapid adenosine release is regulated by nucleoside transporters and metabolism.' *Pharmacology Research & Perspectives*, 3, e00189.

Nopoulos, P. C. (2016) 'Huntington disease: a single-gene degenerative disorder of the striatum.' *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18, 91–8.

Offermanns, S. and Simon, M. I. (1995) 'G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C.' *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15175–80.

Palmer, T. M., Gettys, T. W. and Stiles, G. L. (1995) 'Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor.' *Journal of Biological Chemistry*, 270, 16895–902.

Panickar, K. S. and Norenberg, M. D. (2005) 'Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations.' *Glia*, 50, 287–98.

Pleli, T., Mondorf, A., Ferreiros, N., Thomas, D., Dvorak, K., Biondi, R. M., Heringdorf, D. M. Z., Zeuzem, S., Geisslinger, G., Zimmermann, H., Waidmann, O. and Piiper, A. (2018) 'Activation of Adenylyl Cyclase Causes Stimulation of Adenosine Receptors.' *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45, 2516–2528.

- Poli, A., Lucchi, R., Zottini, M. and Traversa, U. (1993) 'Adenosine A1 receptor-mediated inhibition of evoked glutamate release is coupled to calcium influx decrease in goldfish brain synaptosomes.' *Brain Research*, 620, 245–50.
- Popoli, P., Betto, P., Reggio, R. and Ricciarello, G. (1995) 'Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats.' *European Journal of Pharmacology*, 287, 215–7.
- Rahman, A. (2009) 'The role of adenosine in Alzheimer's disease.' *Current Neuropharmacology*, 7, 207–16.
- Ramakers, B. P., Pickkers, P., Deussen, A., Rongen, G. A., van den Broek, P., van der Hoeven, J. G., Smits, P. and Riksen, N. P. (2008) 'Measurement of the endogenous adenosine concentration in humans in vivo: methodological considerations.' *Current Drug Metabolism*, 9, 679–85.
- Ribeiro, J. A., Sebastião, A. M. and de Mendonça, A. (2002) 'Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications.' *Progress in Neurobiology*, 68, 377–392.
- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Ritzel, R. G., Mowles, D. A., Carpenter, P., Chen, X. Z., Karpinski, E., Hyde, R. J., Baldwin, S. A., Cass, C. E. and Young, J. D. (2001) 'Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib).' *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2914–27.
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Huang, M. Y., Elliott, J. F., Cass, C. E. and Young, J. D. (1997) 'Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1).' *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 272, C707–C714.
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Ng, A. M., Mackey, J. R., Cass, C. E. and Young, J. D. (no date) 'Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na<sup>+</sup>/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine.' *Molecular Membrane Biology*, 15, 203–11.
- Rivkees, S. A. and Reppert, S. M. (1992) 'RFL9 encodes an A2b-adenosine receptor.' *Molecular Endocrinology*, 6, 1598–1604.
- Sexl, V., Mancusi, G., Höller, C., Gloria-Maercker, E., Schütz, W. and Freissmuth, M. (1997) 'Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells.' *Journal of Biological Chemistry*, 272, 5792–9.
- Shao, Y.-M., Ma, X., Paira, P., Tan, A., Herr, D. R., Lim, K. L., Ng, C. H., Venkatesan, G., Klotz, K.-N., Federico, S., Spalluto, G., Cheong, S. L., Chen, Y. Z. and Pastorin, G. (2018) 'Discovery of indolylpiperazinylpyrimidines with dual-target profiles at adenosine A2A and dopamine D2 receptors for Parkinson's disease treatment.' *PLOS ONE*, 13, e0188212.
- Schiffmann, S. N., Jacobs, O. and Vanderhaeghen, J. J. (1991) 'Striatal restricted adenosine A2 receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study.' *Journal of Neurochemistry*, 57, 1062–7.
- Schulte, G. and Fredholm, B. B. (2000) 'Human adenosine A(1), A(2A), A(2B), and A(3) receptors expressed in Chinese hamster ovary cells all mediate the phosphorylation of extracellular-regulated kinase 1/2.' *Molecular Pharmacology*, 58, 477–82.
- Schulte, G. and Fredholm, B. B. (2003a) 'Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases.' *Cellular Signalling*, 15, 813–27.
- Schulte, G. and Fredholm, B. B. (2003b) 'The G(s)-coupled adenosine A(2B) receptor recruits divergent pathways to regulate ERK1/2 and p38.' *Experimental Cell Research*, 290, 168–76.



- Simpson, R. E., O'Regan, M. H., Perkins, L. M. and Phillis, J. W. (1992) 'Excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: effects of adenosine receptor agonists and antagonists.' *Journal of Neurochemistry*, 58, 1683–90.
- Skladanowski, A. C. and Newby, A. C. (1990) 'Partial purification and properties of an AMP-specific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart.' *Biochemical Journal*, 268, 117–22.
- Sternweis, P. C. and Smrcka, A. V (1993) 'G proteins in signal transduction: the regulation of phospholipase C.' *Ciba Foundation Symposium*, 176, 96-106–11.
- Stockwell, J., Chen, Z., Niazi, M., Nosib, S. and Cayabyab, F. S. (2016) 'Protein phosphatase role in adenosine A1 receptor-induced AMPA receptor trafficking and rat hippocampal neuronal damage in hypoxia/reperfusion injury.' *Neuropharmacology*, 102, 254–65.
- Sveinbjornsdottir, S. (2016) 'The clinical symptoms of Parkinson's disease.' *Journal of Neurochemistry*, 139, 318–324.
- Thorn, J. A. and Jarvis, S. M. (1996) 'Adenosine transporters.', *General Pharmacology: The Vascular System*, 27, 613–620.
- Trussell, L. O. and Jackson, M. B. (1985) 'Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 4857–61.
- Tsutsui, S., Schnermann, J., Noorbakhsh, F., Henry, S., Yong, V. W., Winston, B. W., Warren, K. and Power, C. (2004) 'A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis.' *Journal of Neuroscience*, 24, 1521–9.
- Tyebji, S., Saavedra, A., Canas, P. M., Pliassova, A., Delgado-García, J. M., Alberch, J., Cunha, R. A., Gruart, A. and Pérez-Navarro, E. (2015) 'Hyperactivation of D1 and A2A receptors contributes to cognitive dysfunction in Huntington's disease.' *Neurobiology of Disease*, 74, 41–57.
- Ueland, P. M. (1982) 'Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase.' *Pharmacological Reviews*, 34.
- Vijayalakshmi, D. and Belt, J. A. (1988) 'Sodium-dependent nucleoside transport in mouse intestinal epithelial cells. Two transport systems with differing substrate specificities.' *Journal of Biological Chemistry*, 263, 19419–23.
- Wang, J., Su, S. F., Dresser, M. J., Schaner, M. E., Washington, C. B. and Giacomini, K. M. (1997) 'Na(+)-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization.' *American Journal of Physiology*, 273, F1058-65.
- Wardas, J. (2002) 'Neuroprotective role of adenosine in the CNS.' *Polish Journal of Pharmacology*, 54, 313–26.
- Wei, C. J., Singer, P., Coelho, J., Boison, D., Feldon, J., Yee, B. K. and Chen, J.-F. (2011) 'Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning.' *Learning & Memory*, 18, 459–74.
- Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de Jong, P., Reed, R. R., Simon, M. I., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1992) 'Evolution of the mammalian G protein  $\alpha$  subunit multigene family.' *Nature Genetics*, 1, 85–91.
- Wu, X., Yuan, G., Brett, C. M., Hui, A. C. and Giacomini, K. M. (1992) 'Sodium-dependent nucleoside transport in choroid plexus from rabbit. Evidence for a single transporter for purine and pyrimidine nucleosides.' *Journal of Biological Chemistry*, 267, 8813–8.

- Xiao, D., Bastia, E., Xu, Y.-H., Benn, C. L., Cha, J.-H. J., Peterson, T. S., Chen, J.-F. and Schwarzschild, M. A. (2006) 'Forebrain adenosine A2A receptors contribute to L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice.' *Journal of Neuroscience*, 26, 13548–55.
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Muzyka, W. R., Griffiths, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A. and Young, J. D. (1997) 'Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues.' *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28423–30.
- Yoon, K. W. and Rothman, S. M. (1991) 'Adenosine inhibits excitatory but not inhibitory synaptic transmission in the hippocampus.' *Journal of Neuroscience*, 11, 1375–80.
- Yoshioka, K., Saitoh, O. and Nakata, H. (2001) 'Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 7617–22.
- Young, J. D., Yao, S. Y. M., Sun, L., Cass, C. E. and Baldwin, S. A. (2008) 'Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins.' *Xenobiotica*, 38, 995–1021.
- Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L. and Civelli, O. (1992) 'Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor.' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 7432–6.
- Zhu, X., Mei, M., Lee, H., Wang, Y., Han, J., Perry, G. and Smith, M. A. (2005) 'P38 Activation Mediates Amyloid- $\beta$  Cytotoxicity.' *Neurochemical Research*, 30, 791–796.
- Zimmermann, H., Zebisch, M. and Sträter, N. (2012) 'Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases.' *Purinergic Signalling*, 8, 437–502.