



UNIVERSITAT<sup>DE</sup>  
BARCELONA

## Interacción funcional entre la adenosina desaminasa y el receptor A1 de adenosina en la superficie celular

Carlos A. Saura Antolín



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

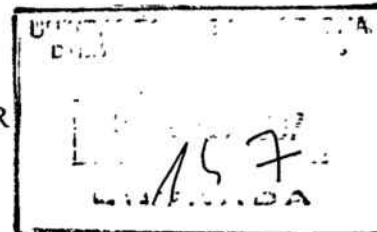
INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LA ADENOSINA  
DESAMINASA Y EL RECEPTOR A<sub>1</sub> DE ADENOSINA  
EN LA SUPERFICIE CELULAR

CARLOS A. SAURA ANTOLÍN

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700186750



**INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LA ADENOSINA  
DESAMINASA Y EL RECEPTOR A<sub>1</sub> DE ADENOSINA  
EN LA SUPERFICIE CELULAR**

Memoria presentada por el licenciado en Ciencias Químicas **Carlos A. Saura Antolín** para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.



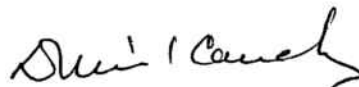
Carlos A. Saura Antolín

Esta tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de *Bioquímica*, bienio 1995-1997, de la Universitat de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Carlos A. Saura Antolín bajo la dirección de los Drs. Rafael Franco Fernández y E. I. Canela Campos en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Diciembre 1997



Rafael Franco Fernández



Enric. I. Canela Campos

**Als meus pares**

**A l'Ada**

Cierto día se hallaba Govinda descansando, en compañía de otros monjes, en los jardines que la cortesana Kamala regalara a los discípulos de Gotama, y oyó hablar de un anciano barquero que vivía junto al río, y a quien muchos consideraban un sabio. Pues aunque Govinda hubiera vivido siempre en la observación de la regla y fuera considerado con respeto por los monjes jóvenes en razón de su edad y de su modestia, la inquietud y el afán de búsqueda no se habían extinguido en su corazón.

Llegó al río, pidió al anciano que lo trasladara a la otra orilla, y al desembarcar le dijo:

- ...¿No serás tú también, barquero, uno de los que buscan el recto camino?

Los viejos ojos de Siddhartha sonrieron cuando contestó:

- ¿Cómo puedes llamarte un buscador, oh venerable, estando tan cargado de años y llevando el hábito de los monjes de Gotama?

- Es cierto que soy viejo, pero nunca he dejado de buscar y nunca dejaré de hacerlo: creo que tal es mi destino. Y me parece que también tú has buscado. ¿Quisieras decirme unas palabras honorable?

- ¿Qué podría decirte, oh venerable?. ¿Quizá que buscas demasiado y que a fuerza de buscar ya no encuentras?

- ¿Cómo así?- preguntó Govinda

- Cuando alguien busca- dijo Siddhartha-, suele ocurrir que sus ojos sólo ven aquello que anda buscando, y ya no logra encontrar nada ni se vuelve receptivo a nada porque sólo piensa en lo que busca, porque tiene un objetivo y se halla poseído por él. Buscar significa tener un objetivo. Pero encontrar significa ser libre, estar abierto, carecer de objetivos. Tú, honorable, quizá seas de verdad un buscador, pues al perseguir tu objetivo no ves muchas cosas que tienes a la vista.

*Siddhartha,*  
Hermann Hesse, 1950.

## AGRAÏMENTS

Aquesta Tesi Doctoral és dedicada a aquelles persones que m'han recolzat i ajudat durant el llarg camí que ha comprès la seva realització. Una Tesi Doctoral representa molts sacrificis professionals i personals. Sense l'ajut i estima d'aquestes persones hagués sigut molt difícil portar a terme un projecte com aquest. Una Tesi Doctoral va més enllà del treball de recerca, per a mi ha consistit en aprofitar certs moments únics i inoblidables. Tot això ha estat possible gràcies a aquestes persones, per la qual cosa també són responsables del treball reflectit en aquesta memòria.

Als meus directors Rafael Franco i Enric. I. Canela els vull agrair el seu inestimable ajut i suport rebuts durant la realització d'aquest projecte. A la Dra. Carme Lluís li vull agrair, entre altres coses, haver-me il·lusionat i l'interès mostrat en les discussions científiques, així com el seu ajut durant la part experimental i l'escriptura d'aquesta memòria. A la Dra. Josefa Mallol el seu ajut durant la part experimental d'aquesta Tesi.

Una part important dels mèrits els hi dec als meus companys de laboratori. Al meu amic Francisco Ciruela, amb qui vaig tenir la sort de treballar i compartir els millors moments d'aquesta Tesi, li haig d'agrair tot el que m'ensenyà, les discussions científiques que vam compartir, la seva comprensió i la seva amistat. A l'Agustín el seu ajut, amistat i sobretot els bons moments passats entre cervesa i cervesa. A la Sílvia, Carol, Sara, Marisol i Ruth per haver-me alegrat els dies, per haver confiat en mi i per passar de mi en algunes ocasions. A la resta de companys l'Àngels, Maribel, Rafa, Lluís i Pep els bons moments compartits dins i fora del laboratori. Com a alumnes interns la Montse i en Jordi van posar la seva il·lusió per aprendre i donar-me ànims en tot moment.

Al Jaume Comas i la Chary del Servei Científico-Tècnics els vull manifestar el meu agraïment pel seu ajut en els experiments de citometria de fluxe. A la Susana Castel i Elisenda Coll per la seva *pacència* amb mi en el Servei de Microscopia Comfocal. A la Catalina Relaño la seva eficient feina per mantenir el Servei de Cultius Cel·lulars lliure d'éssers estranys.

Durant tot aquest temps, ha sigut molt important per a mi el constant suport rebut per la meua família i amics. Als meus pares, germanes i resta de la família pel vostre amor i haver estat disposats a comprendre'm en tot moment. Al Jordi i l'Andreu (*el penjat*) per la seva amistat i comprensió. Als meus estimats amics Ramon, Albert, Javi (*Arabia*) i Albert (*Figa*) per no haver-me fallat mai, per estar al meu costat en tot moment i per haver compartit tantes històries-Aplec's, Alifares, Benicàssims, acampades, *cocktail parties*, Smashing Pumpkins, moskovskaies, moments inoblidables... - fins al final ... *Mira si he corrido tierras...!!!*

A l'Ada li dec l'haver estat la meua llum, haver-me ensenyat el seu món i haver compartit amb mi el seu amor més sincer.

# ÍNDICE

<b>1. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSINA EXTRACELULAR.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Papel de la adenosina como regulador fisiológico.....	5
2.1.2. Mecanismos de producción y eliminación de adenosina extracelular.....	6
2.1.2.1. Formación de adenosina en el citoplasma celular .....	6
2.1.2.2. Formación de adenosina en el espacio extracelular.....	8
2.1.2.3. Transportadores nucleosídicos de membrana.....	10
<b>2.2. ADENOSINA DESAMINASA.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Caracterización molecular y cinética de la adenosina desaminasa .....	12
2.2.2. Distribución tisular de la adenosina desaminasa. Ecto-adenosina desaminasa.....	15
2.2.3. Proteínas de unión de la ecto-adenosina desaminasa.....	17
2.2.4. Función fisiológica de la ecto-adenosina desaminasa.....	19
<b>2.3. RECEPTORES PURINÉRGICOS.....</b>	<b>21</b>
2.3.1. Clasificación de los receptores purinérgicos.....	22
2.3.2. Receptores de adenosina .....	25
<b>2.4. RECEPTOR A<sub>1</sub> DE ADENOSINA.....</b>	<b>29</b>
2.4.1. Caracterización molecular del receptor A <sub>1</sub> .....	29
2.4.2. Caracterización cinética del receptor A <sub>1</sub> .....	34
2.4.3. Transducción de señal a través del receptor A <sub>1</sub> .....	39
2.4.4. Distribución tisular del receptor A <sub>1</sub> .....	45
2.4.5. Efectos fisiológicos de la adenosina a través del receptor A <sub>1</sub> .....	46
2.4.6. Regulación del receptor A <sub>1</sub> en la membrana celular.....	49
2.4.6.1. Características generales de la desensibilización homóloga.....	49
2.4.6.2. Características generales de la desensibilización heteróloga.....	55
2.4.6.3. Desensibilización del receptor A <sub>1</sub> .....	56
<b>3.RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1. ADENOSINE DEAMINASE INTERACTS WITH A<sub>1</sub> ADENOSINE RECEPTORS IN     PIG BRAIN CORTICAL MEMBRANES.....</b>	<b>62</b>
3.1.1. Abstract .....	64

3.1.2. Introduction .....	64
3.1.3. Materials and Methods.....	65
3.1.4. Results .....	67
3.1.5. Discussion .....	69
3.1.6. References .....	70
<b>3.2. ADENOSINE DEAMINASE AFFECTS LIGAND - INDUCED SIGNALING BY INTERACTING WITH CELL SURFACE ADENOSINE RECEPTORS.....</b>	<b>72</b>
3.2.1. Abstract.....	74
3.2.2. Introduction .....	74
3.2.3. Materials and Methods .....	74
3.2.4. Results and Discussion .....	76
3.2.5. References .....	78
<b>3.3.LIGAND-INDUCED PHOSPHORYLATION, CLUSTERING AND DESENSITIZATION OF A<sub>1</sub> ADENOSINE RECEPTORS.....</b>	<b>80</b>
3.3.1. Summary .....	82
3.3.2. Introduction .....	82
3.3.3. Experimental Procedures .....	83
3.3.4. Results .....	85
3.3.5. Discussion .....	87
3.3.6. References .....	90
<b>3.4.ADENOSINE DEAMINASE AND A<sub>1</sub> ADENOSINE RECEPTORS ARE INTERNALIZED TOGETHER FOLLOWING AGONIST-INDUCED DESENSITIZATION.....</b>	<b>92</b>
3.4.1. Summary .....	94
3.4.2. Introduction .....	94
3.4.3. Experimental Methods.....	95
3.4.4. Results .....	97
3.4.5. Discussion .....	104
3.4.6. References .....	106
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>108</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>121</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>



## ABREVIATURAS

ABMECA	N <sup>6</sup> -4-aminobenzil-5'-metilcarboxamidoadenosina
ABOPX	3-(4-aminofenil)-8-(4-oxiacetofenil)-1-propilxantina
ADA	Adenosina desaminasa
ADAbp (CD26)	Proteína de unión de la adenosina desaminasa
Ado	Adenosina
ADP	5'-difosfato de adenosina
AMP	5'-monofosfato de adenosina
AMP <sub>c</sub>	3', 5'-monofosfato de adenosina
APNEA	N <sup>6</sup> -2-(4-aminofenil)etiladenosina
ATP	5'-trifosfato de adenosina
Ap <sub>n</sub> A	Diadenosina polifosfatos
B <sub>max</sub>	Capacidad máxima de unión
β <sub>2</sub> AR	Receptor β <sub>2</sub> -adrenérgico
βARK	Quinasa del receptor β adrenérgico
CADO	2-cloroadenosina
CCPA	2-cloro- N <sup>6</sup> -ciclopentiladenosina
CGS21680	2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
CHA	N <sup>6</sup> -ciclohexiladenosina
CHAPS	3-[3-(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CPA	N <sup>6</sup> -ciclopentiladenosina
CV1808	2-fenilaminoadenosina
DAG	Diacilglicerol
DCF	2'-desoxicoformicina
DPCPX	1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
DPX	1,3-dipropilxantina
EC <sub>50</sub>	Concentración de reactivo que produce el 50% de respuesta máxima
EHNA	9-(eritro-2-hidroxi-3-nonil)adenosina
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDP	5'-difosfato de guanosina
GMP	5'-monofosfato de guanosina
GMP <sub>c</sub>	3',5'-monofosfato de guanosina
Gpp(NH)p	5'-difosfato de guanililimida
GRK	Quinasa de receptor acoplado a proteína G
GTP	5'-trifosfato de guanosina
HDPR	6(R)-hidroxil-1,6-dihidropurina ribonucleósido

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IMP	5'-monofosfato de inosina
IP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4, 5-trifosfato
kDa	Kilodalton
K <sub>d</sub>	Constante de equilibrio de disociación
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
KFM19	(±)-8-3-oxociclopentil-1,3-dipropilxantina
KF17837	1,3-dipropyl-8-(3,4-dimethoxystyryl)-7-methylxanthine
NAD <sup>+</sup>	Nicotín-adenín-dinucleótido
NADP	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NBMPR	Nitrobenziltioinosina
NECA	5'-N-etilcarboxamidoadenosina
NEM	N-etilmaleimida
PAPA-APEC	2-[4-[2-[2-[(4-aminofenil)metilcarbonilamino]etilaminocarbonil]etil]fenil]-etilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
PD81723	(3-(3-trifluorometil)benzofenona)-2-amino-4,5-dimetiltiofeno
PIA	N <sup>6</sup> -fenilisopropiladenosina
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
8-PT	8-fenilteofilina
RA <sub>1</sub>	Receptor A <sub>1</sub> de adenosina
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfonato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
S-ENBA	1R, 2S, 4S-2-endo-norborniladenosina
8-pSPT	8- <i>p</i> -sulfofenilteofilina
t <sub>1/2</sub>	Tiempo en el cual se produce un 50% de respuesta máxima
TCR	Receptor de la célula T
TRITIC	isotiocianato de rodamina
UTP	5'-trifosfato de uridina
XAC	8(4-[[[(2-aminoetil)amino]carbonil]metil]-oxi]metil)-oxifenil)-1,3-dipropilxantina

# **1. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS**

## 1. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS

Durante los últimos años el trabajo del grupo de investigación, en el que se enmarca esta Tesis Doctoral, se ha centrado en la caracterización de las proteínas capaces de reconocer la adenosina extracelular. La caracterización cinética y molecular del transportador nucleosídico equilibrativo, de la ecto-adenosina desaminasa y de los receptores de adenosina, eran motivo de estudio en el momento de iniciarse la investigación que se presenta en esta memoria. El interés por estas proteínas de membrana reside en su implicación en el control de los efectos fisiológicos inducidos por la adenosina en las células.

Al principio de la década de los noventa nuestro grupo de investigación había caracterizado, cinética y molecularmente, el receptor  $A_1$  de adenosina de la corteza cerebral de cerdo. En la determinación de los parámetros cinéticos del receptor  $A_1$  se empleaban técnicas de unión de agonistas y antagonistas tritiados, metabólicamente estables. En estos experimentos, tanto nuestro grupo de investigación como otros grupos, preincubaban las membranas con la enzima adenosina desaminasa (ADA) con la finalidad de que la adenosina endógena no interfiriese en la unión de los radioligandos. Sin embargo, las notorias variaciones halladas en los parámetros cinéticos de unión de los agonistas y antagonistas sintéticos en presencia de ADA no se justificaba por la presencia de adenosina endógena en las preparaciones de membranas. Debido a este hecho, al inicio de esta Tesis nos planteamos el estudio del mecanismo de acción de la ADA sobre el receptor  $A_1$  en membranas de corteza cerebral de cerdo.

Mediante técnicas de coimmunoprecipitación y cromatografía de afinidad se ha puesto de manifiesto la interacción molecular entre la ADA y el receptor  $A_1$  en membranas de corteza cerebral de cerdo. Este hecho es importante por varias razones. En primer lugar, la ADA es una proteína globular que no posee ningún dominio estructural de anclaje a la membrana celular por lo que requiere de alguna molécula que actúe como proteína de unión de ADA. Hasta este momento sólo se había identificado el antígeno de diferenciación linfocitario CD26 como proteína de unión. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis abren una nueva perspectiva ya que moléculas distintas al CD26, como el receptor  $A_1$  de adenosina, pueden actuar como proteínas de unión de ADA a la membrana. En segundo lugar, ésta es la primera vez que se demuestra la interacción a nivel molecular entre un receptor acoplado a proteína G y la enzima que degrada su ligando natural, lo que sugiere que la ecto-ADA puede tener una función fisiológica extraenzimática.

El estudio de la función fisiológica de la ecto-ADA al interactuar con el receptor  $A_1$  ha sido el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral. Para ello se escogió como modelo de estudio las células derivadas de musculatura lisa DDT<sub>1</sub>MF-2, las cuales expresan receptores  $A_1$  de adenosina con características cinéticas idénticas a los receptores de corteza cerebral. En este sistema, la interacción de la ADA y el receptor  $A_1$  favorece el acoplamiento de éste y la proteína  $G_i$ , lo que permite la correcta transducción de la señal a través de este receptor, de manera que es necesaria la unión de la ecto-ADA al receptor para que los agonistas sean capaces de estimular la producción de segundos mensajeros.

Uno de los temas actuales de gran interés en la familia de receptores acoplados a proteínas G, es el estudio de los mecanismos implicados en la desensibilización de estos receptores. Si bien se había descrito la desensibilización homóloga del receptor  $A_1$  en respuesta a agonistas, los mecanismos involucrados en la desensibilización de este receptor estaban aún por elucidar. El tercer objetivo de esta Tesis ha consistido en profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la desensibilización homóloga del receptor  $A_1$  y en el papel que la ecto-ADA tiene durante este proceso. A este respecto, hemos puesto de manifiesto que la desensibilización homóloga de los receptores  $A_1$  está mediada por una serie de mecanismos moleculares tales como la fosforilación del receptor, la agregación del receptor y de la ADA en la membrana, el desacoplamiento funcional del receptor, y la internalización conjunta de ambas proteínas a través de la misma vía de endocitosis. Además, la ecto-ADA modula todos los procesos involucrados en el fenómeno de desensibilización del receptor  $A_1$ .

Los resultados obtenidos en esta Tesis ponen de manifiesto, por primera vez, la interacción en la membrana plasmática y la modulación mutua de diferentes proteínas encargadas de regular la concentración y los efectos de la adenosina a nivel extracelular, lo que confiere a éstas proteínas un papel multifuncional.

## 2. INTRODUCCIÓN

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. REGULACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADENOSINA EXTRACELULAR

#### 2. 1. 1. Papel de la adenosina como regulador fisiológico

La adenosina es un nucleósido formado estructuralmente por una base purínica de adenina y una ribosa (Figura 1). La adenosina y sus derivados participan en numerosos procesos metabólicos y de regulación que tienen lugar en las células de los tejidos de los organismos superiores. Los nucleótidos de adenina, principalmente en forma de ATP, son la fuente principal de energía en las rutas anabólicas y catabólicas de la célula. Además, estos compuestos participan en numerosos procesos de regulación metabólica modificando, mediante reacciones de fosforilación o directamente como segundos mensajeros ( $AMP_c$  y  $ADPR_c$ ), la actividad de numerosas proteínas involucradas en el metabolismo, en interacciones proteína-proteína y en cascadas de transducción de señal. Los derivados de adenosina  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ , FAD y coenzima A intervienen como cofactores en numerosas reacciones enzimáticas de oxidación-reducción. Por otra parte, las purinas junto con las pirimidinas, componen la base estructural de la información genética almacenada en forma de DNA y RNA.

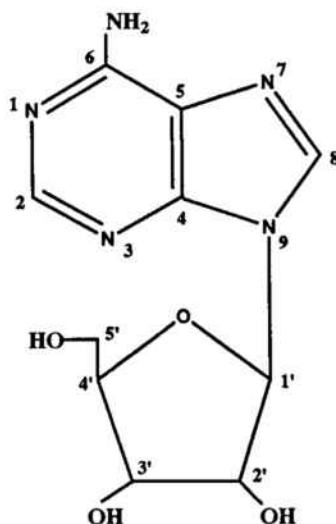


Figura 1. Estructura química de la adenosina

Además de su importante papel en el metabolismo celular los nucleótidos y nucleósidos purínicos ATP, ADP, diadenosina polifosfatos y adenosina, ejercen funciones de regulación a través de receptores específicos de membrana participando en numerosas funciones fisiológicas y patológicas (Burnstock, 1989; Windscheif, 1996). Los efectos fisiológicos de la adenosina en la mayoría de tejidos están mediados principalmente por su acción sobre los receptores purinérgicos de tipo P<sub>1</sub> localizados en la membrana celular (Dalziel and Westfall, 1994). A través de estos receptores, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G, la adenosina actúa como hormona autocrina y paracrina en la mayoría de órganos y tejidos (apartado 2. 4. 5).

## **2. 1. 2. Mecanismos de producción y eliminación de adenosina extracelular**

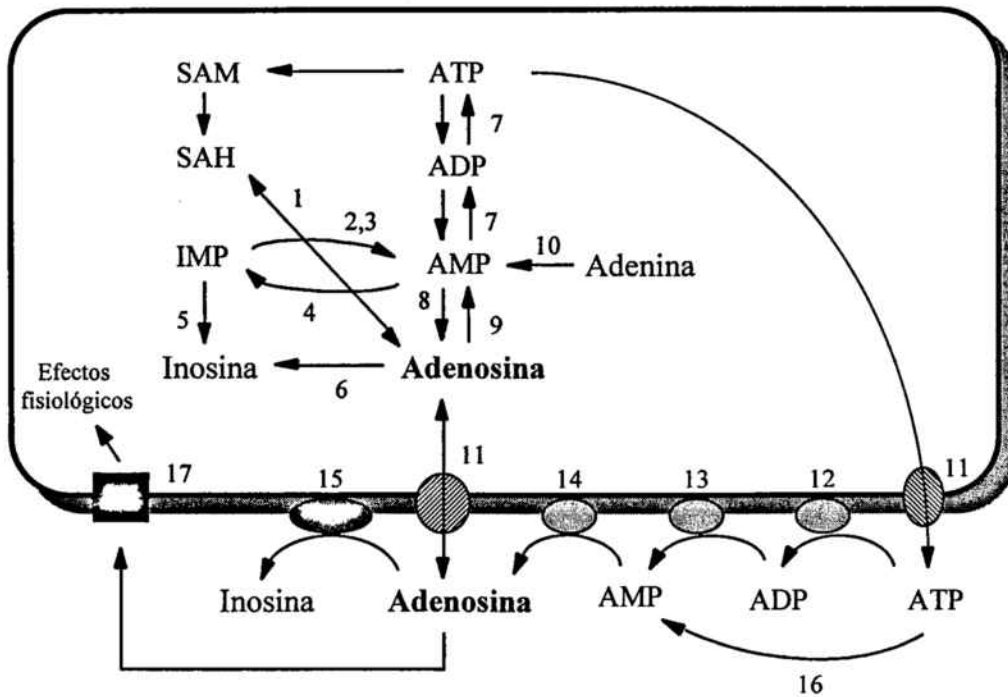
La adenosina se encuentra presente tanto en el interior como en el exterior de la célula, siendo su concentración, en ambos compartimentos, determinada por el balance entre su biosíntesis y su degradación. En el citoplasma celular la adenosina es un metabolito intermediario del metabolismo purínico cuya síntesis y degradación está determinada por el estado energético de la célula, es decir, por las concentraciones de ATP, ADP y AMP. La adenosina extracelular se forma por hidrólisis de nucleótidos de adenina (ATP, ADP y AMP) por acción de ecto-nucleotidasas y es catabolizada por la ecto-adenosina desaminasa (Zimmermann, 1996). Por otro lado, tanto la adenosina intracelular como la presente en el medio extracelular son totalmente intercambiables, ya que transportadores específicos de nucleósidos transfieren la adenosina a ambos lados de la membrana (Figura 2; Thorn and Jarvis, 1996).

### **2. 1. 2. 1. Formación de adenosina en el citoplasma celular**

Las dos vías implicadas en la formación de adenosina intracelular son el metabolismo purínico y las reacciones de metilación (Figura 2). La producción relativa de adenosina por cada una de estas vías depende del estado energético de la célula. En condiciones normales la adenosina se genera por hidrólisis de la S-adenosilhomocisteína (SAH) por acción de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (SAHH, EC 3.3.1.1). El SAH es un intermediario de las reacciones de metilación cuyo precursor es el dador de grupos metilos S-adenosilmetionina (SAM). Sin embargo, cuando se produce un desequilibrio entre la demanda y el aporte



energético, como por ejemplo en estados de hipoxia o aumentos del consumo energético, la adenosina se forma rápidamente por desfosforilación consecutiva de los nucleótidos ATP, ADP y AMP (Meghji, 1993). La hidrólisis consecutiva de ATP, ADP y AMP es catalizada por nucleotidasas específicas. El AMP generado de esta manera, formado a partir de IMP o sintetizado a partir de adenina, puede ser desfosforilado a adenosina mediante la 5'-nucleotidasa citosólica. Existen dos formas proteicas solubles de 5'-nucleotidasa (c-N-I y c-N-II). La primera tiene una mayor afinidad por el AMP, mientras que la segunda tiene mayor afinidad por el IMP que por el AMP (Zimmermann, 1992). Además, mientras la segunda forma (c-N-II) tiene una distribución tisular amplia, la primera (c-N-I) ha sido únicamente caracterizada en corazón de vertebrados donde se expresa junto a la c-N-II (Skladanowski and Newby, 1990; Yamazaki et al., 1991).



**Figura 2. Metabolismo intra y extracelular de la adenosina.**

1, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; 2, adenilosuccinato sintetasa; 3, adenilosuccinato liasa; 4, adenilato desaminasa; 5, 5'-nucleotidasa c-N-II; 6, adenosina desaminasa; 7, adenilato quinasa; 8, 5'-nucleotidasa c-N-I; 9, adenosina quinasa; 10, adenina-fosforibosil transferasa; 11, transportador nucleosídico; 12, ecto-ATPasa; 13, ecto-ADPasa; 14, ecto-5'-nucleotidasa; 15, ecto-adenosina desaminasa; 16, ecto-ATP-difosfohidrolasa; 17, receptores de adenosina.

La adenosina puede ser fosforilada a AMP por la adenosina quinasa (EC 2.7.1.20) o ser desaminada a inosina por la adenosina desaminasa citosólica (ADA; EC 3.5.4.4). En general, la fosforilación es la principal vía de desaparición de la adenosina intracelular (Gu and Geiger, 1992), aunque cuando su concentración es elevada, por ejemplo en condiciones de hipoxia, es básicamente desaminada (Fisher and Newsholme, 1984). La adenosina formada intracelularmente puede ser transportada al medio extracelular a través de la membrana por los transportadores nucleosídicos. En estados de gran actividad metabólica, por ejemplo en hipoxia y estrés, se produce una gran cantidad de adenosina y, como consecuencia de la falta de ATP disponible, la adenosina no transformada a inosina por la adenosina desaminasa, aparece en el espacio extracelular mediante el transporte de difusión facilitada.

### **2. 1. 2. 2. Formación de adenosina en el espacio extracelular**

La adenosina extracelular procede principalmente de la hidrólisis de ATP, ADP, AMP y diadenosina polifosfatos ( $A_{p_n}A$ ) procedentes de la propia célula o de células vecinas y del transporte desde el citosol celular cuando su producción intracelular aumenta. Los nucleótidos de purina en el espacio extracelular son degradados por una gran variedad de ecto-enzimas, conocidas con el nombre genérico de ecto-nucleotidasas, capaces de hidrolizar esos compuestos (Gordon et al., 1989; Zimmerman, 1996). En el cerebro (Wu and Phillis, 1978), en sinaptosomas (Fiedler et al., 1992), en atrium (Tokunaga et al., 1995), en células cromafines adrenales (White et al., 1987), en vaso deferente (Drake and Petersen, 1992) y en uniones neuromusculares (Redman and Silinsky, 1994), el ATP es almacenado y liberado en vesículas de secreción junto con neurotransmisores clásicos, como acetilcolina o catecolaminas. Por otro lado, las células activadas neuronalmente, tales como células de musculatura lisa (von Kügelgen et al., 1994) o estriada (Cunha and Sebastiao, 1993), liberan ATP mediante canales de membrana que actúan como transportadores de ATP. Los derivados de diadenosina  $A_{p_n}A$  también son almacenados junto con ATP y catecolaminas en vesículas sinápticas y gránulos de secreción. Posteriormente estas vesículas se liberan por exocitosis al medio extracelular (Rodríguez del Castillo et al., 1988; Pintor et al., 1991, 1992, 1997b).

En el espacio extracelular los nucleótidos de purina son hidrolizados hasta adenosina por ecto-nucleotidasas presentes en una gran variedad de tejidos, aunque su expresión puede estar restringida a ciertos tipos celulares dentro de un tejido (Zimmerman, 1996, revisión). El ATP se

desfosforila a ADP por acción de la ecto-ATPasa (EC 3.6.1.3) y a AMP por la ecto-ATP-difosfohidrolasa (EC 3.6.1.5) (Ziganshin, 1994). Esta última enzima también sería, junto con la ecto-ADPasa (EC 3.6.1.6), la responsable de la hidrólisis de ADP en AMP. La presencia de ecto-adenilato quinasa (mioquinasa, EC 2.7.4.3) en ciertos tipos celulares sería la responsable de la transformación reversible entre el ADP y el ATP y AMP (Zimmermann, 1996). Por otro lado, las diadenosina polifosfatasa halladas en células cromafines adrenales y células endoteliales de aorta, son las responsables de hidrolizar una gran variedad de  $Ap_nA$  ( $AP_4A$ ,  $AP_5A$  y  $AP_6A$ ) a AMP y  $Ap_{(n-1)}$  (Ogilvie et al., 1989; Rodríguez-Pascual et al., 1992), por lo que estos compuestos también son una fuente de AMP. El AMP generado es desfosforilado a adenosina mediante la ecto-5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5), si bien en músculo esquelético se ha observado la presencia de 5'-AMP desaminasa la cual desaminaría el AMP a IMP (Cunha and Sebastiao, 1991). La ecto-5'-nucleotidasa, enzima dimérica y anclada a la membrana mediante un glicosilfosfatidilinositol (GPI), es una proteína diferente de las dos formas intracelulares. Esta enzima tiene preferencia por AMP y es fuertemente inhibida por ATP y ADP (Zimmerman, 1992). Se ha sugerido que la forma soluble de 5'-nucleotidasa, con características cinéticas y moleculares iguales a la ecto-5'-nucleotidasa, deriva de ésta (Fini et al, 1990; Zimmerman, 1992). Aunque existe la ecto-fosfatasa alcalina, una fosfatasa no específica que hidroliza ATP, ADP y AMP a adenosina, su contribución a la hidrólisis de esos nucleótidos extracelulares parece ser muy baja (Cunha and Sebastiao, 1991).

La adenosina extracelular puede ser desaminada a inosina mediante la acción de la ecto-adenosina desaminasa (ecto-ADA), la cual se ha detectado en cerebro de rata (Centelles et al., 1986), en células sanguíneas (Franco et al., 1990; Aran et al, 1991), en túbulo proximal de riñón (Blanco et al., 1993; Schrader et al., 1994) y en corazón (Meghji et al., 1988). Además, la adenosina puede ser transportada al interior de la célula mediante los transportadores nucleosídicos, proceso encaminado a recuperar los niveles de nucleótidos intracelulares después de su hidrólisis (Thorn and Jarvis, 1996). La ecto-adenosina desaminasa junto con el transportador nucleosídico de purinas serían los sistemas responsables de la disminución de la concentración extracelular de adenosina.

### 2. 1. 2. 3. Transportadores nucleosídicos de membrana

La adenosina, debido a su naturaleza hidrofílica, necesita de sistemas de transporte especializados para atravesar la membrana celular. Existen transportadores nucleosídicos en numerosas células de diferentes tejidos y especies. Su existencia responde a varios factores. En algunos casos, tales como en células intestinales y renales, son necesarios para la reabsorción de nucleósidos provenientes de la dieta o del filtrado glomerular. Algunas células animales tales como enterocitos intestinales, ciertas células cerebrales, eritrocitos y linfocitos, son incapaces de sintetizar de *novo* purinas y deben obtenerlas de la dieta o de la síntesis de *novo* en otras células como los hepatocitos (Murray, 1971). En cualquier caso, los transportadores nucleosídicos modulan los niveles de adenosina plasmáticos y extracelulares, lo cual es importante para regular los efectos de la adenosina a través de sus receptores de membrana. Una prueba de ello es que la inhibición de los transportadores potencia la acción que la adenosina y sus análogos estructurales ejercen a través de sus receptores (Baer and Vriend, 1984; Jarvis, 1988; Geiger and Fyda, 1991).

El intercambio de adenosina entre el interior y el exterior de la célula está mediado por el transportador nucleosídico equilibrativo (o de difusión facilitada) y/o el transportador nucleosídico concentrativo  $\text{Na}^+$ -dependiente. El transportador nucleosídico equilibrativo transporta bidireccionalmente con baja o moderada afinidad ( $K_m$  para la adenosina de 20-50  $\mu\text{M}$ ) nucleósidos purínicos y pirimidínicos (Plagemann et al, 1988). Se han detectado dos tipos de transportadores nucleosídicos equilibrativos que se diferencian por su sensibilidad al inhibidor nitrobenziltioinosina (NBMPR). El transportador *es* (equilibrativo, sensible) tiene una alta afinidad ( $K_d < 5\text{nM}$ ) por el NBMPR y una constante de inhibición baja ( $K_i = 0.1\text{-}1\text{ nM}$ ), lo cual lo caracteriza como el transporte que se inhibe a concentración nanomolar de NBMPR (Plagemann and Woffendin, 1988; Griffith and Jarvis, 1996). El transportador nucleosídico equilibrativo *ei* (equilibrativo, insensible) exhibe menor afinidad por sus sustratos nucleosídicos y es inhibido sólo a concentración alta ( $\mu\text{M}$ ) de NBMPR (Belt and Noel, 1985; Lee and Jarvis, 1988). En algunos tipos celulares el transportador *ei* es el único presente, sin embargo la mayoría de células expresan tanto el *ei* como el *es* en proporciones variables (Plagemann et al, 1988). Recientemente se ha clonado el transportador nucleosídico equilibrativo *es* de placenta humana (Griffiths et al., 1997). El cDNA de este transportador codifica para una glicoproteína de 456 aminoácidos y 50 kDa de peso molecular, la cual se ha predicho que forma 11 segmentos transmembrana. Esta

proteína se expresa principalmente en corazón, cerebro, glándula mamaria, pulmón, hígado fetal, placenta y eritrocitos (Griffiths et al., 1997).

Otro de los mecanismos implicados en el transporte de nucleósidos a través de la membrana es el transporte activo de nucleósidos  $\text{Na}^+$ -dependiente. El transporte activo es un proceso unidireccional, concentrativo y requiere un gasto energético. Este sistema transporta nucleósidos al interior de la célula en contra de su gradiente de concentración junto con un ión  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (Williams et al., 1989; Williams and Jarvis, 1991). Se han caracterizado hasta el momento cuatro transportadores nucleosídicos  $\text{Na}^+$ -dependientes en base a su especificidad de sustrato y sus características moleculares: N1, N2, N3 y N4 (Thorn and Jarvis, 1996). El transportador N1 se encuentra ampliamente distribuido (hígado, yeyuno, pulmón, corazón, cerebro y músculo esquelético) y transporta principalmente nucleósidos purínicos, uridina y desoxiuridina. El clonaje y expresión del transportador N1 muestran que éste es una proteína de 659 aminoácidos, de peso molecular 72 kDa y que probablemente está formada por 14 segmentos transmembrana. Además, su secuencia aminoacídica contiene cinco sitios posibles de N-glicosilación, consenso de unión de ATP/GTP y varios sitios consenso de fosforilación para la PKA y la PKC (Che et al., 1995). El transportador de tipo N2 se ha encontrado únicamente en riñón e intestino, donde transporta nucleósidos pirimidínicos, adenosina y sus análogos (Yao et al., 1996; Vijayalakshmi and Belt, 1988; Williams and Jarvis, 1991). La clonación del transportador nucleosídico N2 de yeyuno de raia ha mostrado que es una proteína formada por 648 aminoácidos, con 14 posibles dominios transmembrana (Huang et al., 1994). El transportador nucleosídico N3 tiene una amplia especificidad de sustrato y únicamente se expresa en epitelio de plexo coroide y yeyuno de rata (Wu et al., 1992). El transportador N4, únicamente se ha encontrado en riñón humano donde tiene una especificidad similar al N2 pero además une guanosina (Gutierrez et al., 1992). Es interesante resaltar que tanto la adenosina como la uridina son sustratos de los cuatro cotransportadores  $\text{Na}^+$ -dependientes. Un nuevo tipo de transportador nucleosídico  $\text{Na}^+$ -dependiente, sensible a NBMPR y dipiridamol ha sido hallado recientemente en células linfoides y podría representar un nuevo tipo, N5, de transportador nucleosídico concentrativo (Griffith and Jarvis, 1996). En algunas células, como por ejemplo células de túbulo renal, se expresan conjuntamente el transportador activo  $\text{Na}^+$ -dependiente y los transportadores equilibrativos, aunque no necesariamente en el mismo dominio de la membrana (Williams et al., 1989).

## 2. 2. ADENOSINA DESAMINASA

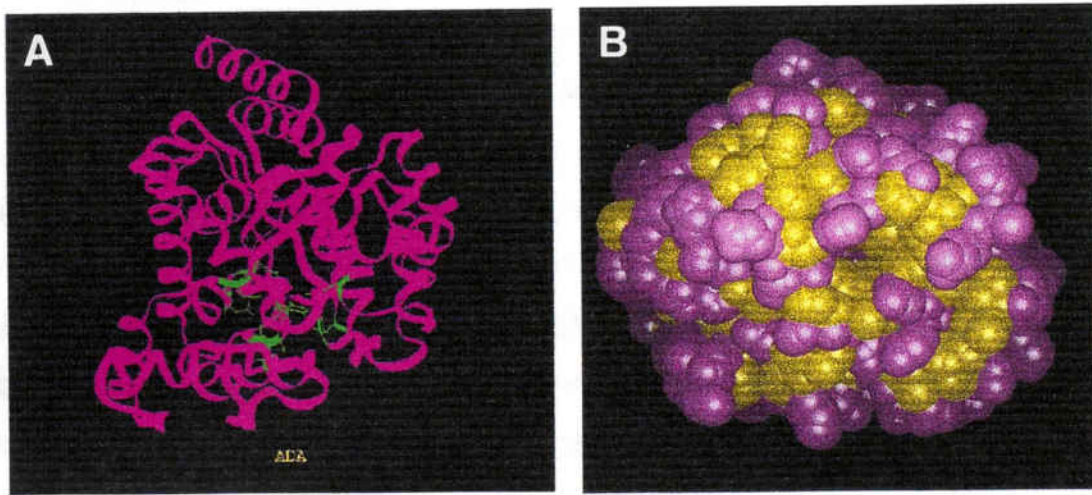
La adenosina desaminasa (ADA, EC 3.5.4.4) es una enzima citosólica cuyo defecto genético causa la inmunodeficiencia severa combinada (Hershfield and Mitchel, 1995). El gen humano de la ADA ha sido clonado y secuenciado (Wiginton et al., 1986), la estructura tridimensional de la proteína ha sido resuelta mediante cristalización y difracción de rayos X (Wilson et al., 1991) y se han generado ratones *knockout* de la enzima en diferentes laboratorios (Wakamiya et al., 1995). Algunos grupos de investigación han mostrado que la ADA aparece unida a la superficie celular, donde degrada adenosina extracelular. Sin embargo, descubrimientos recientes sugieren una función extraenzimática y un papel coestimulador de la ecto-ADA. Catania y colaboradores (1991) han demostrado que la ADA induce en neuronas de cerebelo aumentos en la movilización intracelular de  $Ca^{2+}$  e inositoles fosfato independientemente de su actividad catalítica. La ecto-ADA, activa o inhibida, incrementa la proliferación celular de linfocitos T al interactuar con el marcador de diferenciación linfocitario CD26 y actúa como molécula coestimuladora junto con el TCR/CD3 (Martín et al., 1995; Jeanfavre et al., 1996).

### 2. 2. 1. Caracterización molecular y cinética de la adenosina desaminasa

La adenosina desaminasa es una proteína codificada por un único gen localizado en el cromosoma 20 (Tischfield et al, 1974). La clonación y secuenciación del gen humano ha mostrado que la ADA está formada por 362 aminoácidos y tiene un peso molecular de 41 KDa (Daddona et al, 1984; Wiginton et al., 1986). La posterior secuenciación de la ADA murina (Yeung et al, 1985) y la de E.coli (Chang et al., 1991), y la comparación de las secuencias mostró que existe un 33% de identidad y un 50% de homología entre las enzimas de esos mamíferos y la bacteriana. Además, en la estructura primaria de las tres enzimas hay cuatro secuencias aminoacídicas, de al menos cuatro aminoácidos, que están altamente conservadas, y dos de ellas están también conservadas en cuatro AMP desaminasas estudiadas (Chang et al., 1991).

Hirschhorn y colaboradores (1994) demostraron que la sustitución de una Asn por un Asp es la responsable del polimorfismo genético de la ADA. De hecho, la sustitución de un aminoácido neutro por uno aniónico es consistente con la menor migración electroforética anódica de las bandas proteicas correspondientes al llamado fenotipo 2 respecto al fenotipo 1. Se

ha podido confirmar la existencia de dos alelos en un locus autosomal (alelos 1 y 2). Los fenotipos ADA1, ADA2 y ADA1-2 son producto de la combinación de estos alelos. El fenotipo ADA1 es el más común (89 %), seguido del fenotipo ADA1-2 (11 %) y del ADA2 (0.2 %) (Hirschhorn and Ratech, 1980). Los eritrocitos de donantes que expresan el fenotipo más abundante (ADA1), dan lugar a un patrón electroforético que consiste en una banda mayoritaria y dos bandas minoritarias que son resultado de la modificación postranscripcional de la ADA1.



**Figura 3. Estructura tridimensional de la adenosina desaminasa.**

(A) Estructura tridimensional de la ADA según Wilson et al. (1991) y el centro activo donde se une la adenosina (verde). (B) Estructura globular de la ADA. Los aminoácidos hidrofílicos están representados en color morado y los hidrofóbicos en color amarillo.

En 1991, Wilson y colaboradores, mediante difracción de rayos X, determinaron la estructura tridimensional de la ADA murina unida al análogo del estado de transición 6(*R*)-hidroxil-1,6-dihidropurina ribonucleosido (HDPR) (Figura 3). La estructura secundaria de la ADA está constituida por un dominio de hélice  $\alpha$ /barril  $\beta$ , formada por ocho láminas paralelas  $\beta$  centrales y ocho hélices  $\alpha$  periféricas, además de cinco hélices  $\alpha$  adicionales (Wilson et al, 1991). Esta enzima tiene una estructura muy compacta caracterizada por la presencia mayoritaria de aminoácidos hidrofílicos en su superficie y de pequeños dominios de aminoácidos

hidrofóbicos en su parte más externa. El centro activo está situado entre el extremo C-terminal y los bucles que conectan las láminas del barril  $\beta$ . Además, esta enzima contiene un ión  $Zn^{2+}$  que participa directamente en el mecanismo de la reacción (Wilson et al., 1991; Wilson and Quioco, 1993). Mediante mutagénesis dirigida y estudios estructurales se ha demostrado que el Asp 295, el Asp 296 y el Glu 217 son esenciales para el reconocimiento del sustrato y el proceso catalítico (Wilson and Quioco, 1993; Mohamedali et al., 1996; Sideraki et al., 1996).

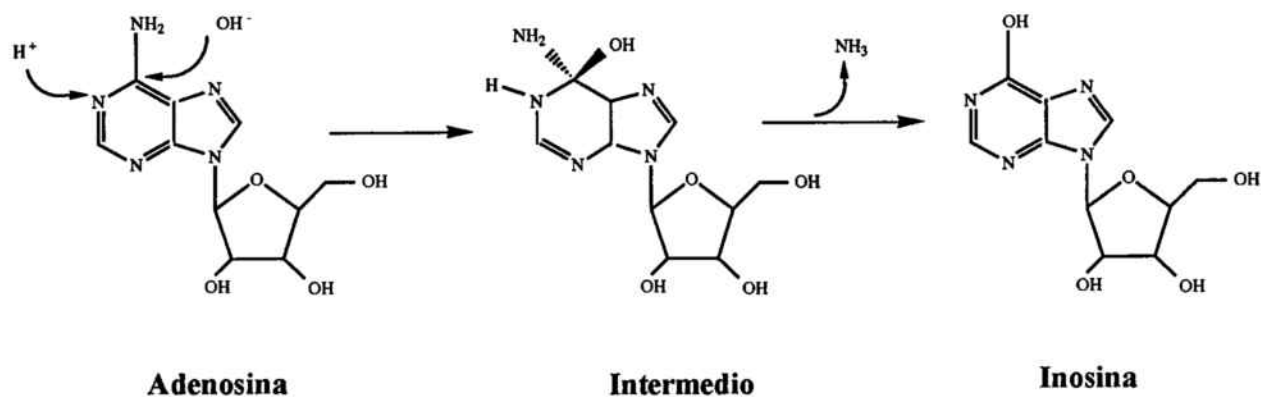
La adenosina desaminasa es una amino hidrolasa que cataliza la desaminación irreversible de adenosina y 2'-desoxiadenosina en inosina y 2'-desoxiinosina respectivamente (Conway and Cooke, 1939). También son sustratos de la ADA los derivados de la adenosina modificados en el anillo purínico o en la molécula de ribosa, pero no así los derivados fosforilados (Agarwal et al., 1975). Esta enzima tiene un comportamiento michaeliano, con una  $K_m$  para la adenosina de 10-100  $\mu M$  y una afinidad ligeramente menor para la 2'-desoxiadenosina (Fonoll et al., 1982; Centelles et al., 1988; Lupidi et al., 1992). El mecanismo de la reacción es una adición-eliminación con dos etapas (Figura 4). La primera consiste en el ataque de una molécula de  $H_2O$  sobre la adenosina, formándose un intermediario tetrahédrico el cual en la segunda etapa produce inosina por medio de la eliminación de amoníaco (Frick et al., 1986; Wolfensen and Frick, 1986). La etapa limitante de la reacción es la formación del intermediario tetrahédrico (Kurz et al., 1985, 1987) y más concretamente la protonación del nitrógeno 1 de la adenosina (Orozco et al., 1989, 1990).

En la caracterización cinética de la ADA se han utilizado tres tipos de inhibidores de la actividad enzimática:

- **Inhibidores análogos estructurales** de la adenosina que conservan el anillo purínico, tales como la inosina, la nebularina, el ribosido de purina (Kurz and Frieden, 1987) y el 1-deazoadenosina (Wilson and Quioco, 1993). Estos inhibidores son de tipo reversible, competitivos y con una constante de inhibición ( $K_i$ ) similar a los valores de la  $K_m$  de la adenosina. Dentro de este grupo, el inhibidor 9-(eritro-2-hidroxi-3 nonil)adenina (EHNA) y sus derivados hidroxilados son los más potentes con  $K_i$  del orden de nanomolar (Vargeese et al., 1997).

- Los **inhibidores análogos del estado de transición** son inhibidores aparentemente irreversibles muy potentes. Entre ellos se encuentran la coformicina (Nakamura et al, 1974), la 2'-desoxicoformicina (Padua et al., 1990; Marrone et al., 1996) y el 6(R)-hidroxil-1,6-dihidropurina ribonucleósido (HDPR). En el caso de la 2'-desoxicoformicina la formación del





**Figura 4. Reacción catalizada por la adenosina desaminasa.**

complejo inicial con la enzima es una etapa rápida y reversible, con una constante de disociación de  $100\mu\text{M}$ . El posterior cambio conformacional de la enzima produce la unión irreversible del inhibidor. Los valores de  $K_i$  descritos para este inhibidor son inferiores a nanomolar (Agarwal et al., 1977; Showalter et al., 1983).

- Los **cationes divalentes** como el  $\text{Cd}^{2+}$ , el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  inhiben parcial o totalmente la actividad enzimática de la ADA (Schrader et al, 1990).

### 2.2.2. Distribución tisular de la adenosina desaminasa. Ecto-adenosina desaminasa

La adenosina desaminasa se encuentra ampliamente distribuida en todos los tejidos de las diferentes especies animales estudiadas hasta el momento. La distribución tisular de la ADA es prácticamente idéntica en el hombre, el ratón y el conejo (Van der Weyden and Kelley, 1976; Trotta et al., 1979; Ungerer et al, 1992). En el tracto gastrointestinal, principalmente en el duodeno, el estómago y el yeyuno, y en los órganos linfoides como el timo y el bazo, es donde se detecta la mayor actividad específica. Por el contrario la tiroides, el riñón, el corazón, el hígado y el músculo esquelético poseen concentraciones mucho menores de esta enzima. Las primeras purificaciones de ADA por técnicas de cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad pusieron de manifiesto la existencia de una gran heterogeneidad molecular de esta

enzima. En tejidos con mayor actividad específica como el timo, el bazo y el estómago se detectaba una forma enzimática de bajo peso molecular (ADA, 36-40 kDa); en cambio, en tejidos con menor actividad enzimática, tales como el riñón, el pulmón, el hígado y el intestino, se detectó predominantemente una forma de elevado peso molecular ( $ADA_{+CP}$ , 200 kDa) (Van der Weyden and Kelley, 1976). Los tratamientos desnaturalizantes con medio ácido provocaban la conversión de la forma de alto peso molecular en la de bajo peso molecular. Además, la forma de bajo peso molecular podía convertirse en la de mayor peso molecular ( $ADA_{+CP}$ ) mediante la unión a una proteína que se denominó *complexing protein* (CP) o *ADA binding protein* (Trotta et al., 1979). En realidad, la forma de alto peso molecular consistía en un dímero de *ADA binding protein* (ADAbp, 95-110 kDa) sin actividad adenosina desaminasa que era capaz de unir dos moléculas de ADA (Daddona and Kelley, 1978). Por otro lado, se ha detectado una forma minoritaria de ADA de peso molecular intermedio (100-110 kDa) codificada por un locus génico diferente (Hirschhorn and Ratech, 1980). Las características cinéticas de esta enzima difieren mucho de la ADA común. Esta forma es resistente a la inhibición por EHNA y DCF, y tiene una afinidad mucho menor por la adenosina, con una  $K_m$  10 veces mayor que para la ADA. Aunque esta forma parece ser importante en especies como anfibios, marsupiales y gallina, en el hombre representa una proporción muy baja; respecto a la actividad ADA total en el bazo y apéndice hay únicamente un 2 %, llegando hasta un 12% en el hígado y un 20% en monocitos (Van der Weyden and Kelley, 1976; Hirschhorn and Ratech, 1980).

En células sanguíneas se detecta una gran expresión de ADA. En linfocitos y monocitos su concentración es unas 10 veces superior a la encontrada en pulmón y músculo. En linfocitos un 80 % corresponde a ADA monomérica y un 20 % a ADA unida a ADAbp (Ungerer et al., 1992). En eritrocitos únicamente se encuentra la forma molecular de 36-40 kDa (Schrader et al., 1979; Daddona and Kelley, 1977).

Hasta finales de los años ochenta no se tuvo evidencia de la existencia de ADA unida extracelularmente a la membrana celular (ecto-ADA). Desde entonces numerosos estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos han sugerido la presencia de la ecto-ADA en eritrocitos (Franco et al., 1990), en plaquetas (Franco et al., 1990), en linfocitos (Dinjens et al., 1986; Aran et al., 1991; Martín et al., 1993), en células endoteliales coronarias (Meghji et al., 1988) y en túbulo proximal de riñón (Blanco et al., 1993; Schrader et al., 1994). Las células sanguíneas han sido el modelo más estudiado para la expresión de ecto-ADA. En linfocitos la expresión de ecto-ADA varía desde el 80 % de la población linfocítica B a un 20 % en la T (Aran et al., 1991).

Curiosamente, a pesar que el número de moléculas de ecto-ADA por célula es mucho mayor en células B que en células T, la actividad enzimática total es mucho mayor en estas últimas (Vives-Corrons et al., 1988; Aran et al., 1991).

Hasta el momento no se han podido detectar diferencias moleculares o de actividad enzimática entre la ADA citosólica y la ecto-ADA. Además, sólo se ha encontrado un único gen para ADA que codifica para una proteína de peso molecular de 36-44 kDa, según la especie, por lo que cabe suponer que la ADA citosólica y la ecto-ADA son idénticas en su secuencia aminoacídica.

### 2. 2. 3. Proteínas de unión de la ecto-adenosina desaminasa

La ausencia de un péptido señal o posibles dominios transmembrana en la molécula de ADA ha llevado a suponer que esta enzima está anclada a la membrana celular a través de una proteína de unión que actuaría a modo de receptor. Tal como se ha descrito en el apartado anterior, a mediados de los años setenta, distintas técnicas de purificación de la enzima evidenciaban la presencia de diferentes formas moleculares de ADA como consecuencia de la interacción de la enzima monomérica con una glicoproteína soluble denominada proteína de unión de ADA o *ADA binding protein* (ADAbp) (Van der Weyden and Kelley, 1976; Schrader et al., 1979). Esta proteína de unión es un dímero de peso molecular 200 kDa, capaz de unir dos moléculas de ADA (Daddona and Kelley, 1978) y que difiere entre las diferentes especies por su composición glicoproteíca (Schrader et al., 1979). La posible participación de la ADAbp como proteína de unión de ecto-ADA empezó a vislumbrarse al descubrirse que podía estar unida a la membrana (Daddona and Kelley, 1978; Schrader and Bryer, 1982). Andy y Kornfeld (1982) descubrieron que la ADAbp era una proteína integral de membrana en fibroblastos humanos. Se pudo caracterizar la unión de la ADA a la ADAbp como una unión saturable de alta afinidad ( $K_d = 10$  nM), que prácticamente no varía entre pH 5-9.5 y que se afecta por la presencia de iones divalentes (Schrader et al., 1990).

Recientemente, se ha demostrado que la ADAbp corresponde a la proteína CD26, un antígeno de diferenciación linfocitario, previamente identificado como dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) (Ulmer et al., 1990). El CD26 es una serín proteasa que hidroliza dipéptidos de la región amino terminal de polipéptidos con L-Pro o L-Ala situados en la penúltima posición (Yaron and Naider, 1993). Hasta el momento no se conoce ningún sustrato

natural del CD26 por lo que el papel fisiológico de este enzima está por elucidar. Recientemente diversos grupos han clonado los cDNA que codifican para el CD26 humano, de rata y de ratón (Marguet et al., 1992; Tanaka et al., 1992; Yaron and Naider, 1993). El CD26 o ADA<sub>bp</sub> es una sialoglicoproteína integral de membrana formada por un dominio intracelular de 6 aminoácidos, una región transmembrana de 22 aminoácidos y un dominio extracelular de 738 aminoácidos, el cual contiene el centro activo y el sitio de unión de la ADA (Fleisher, 1994). La proteína está constituida por dos subunidades idénticas de peso molecular 110 kDa. La capacidad de interacción entre el CD26 y la ADA se ha puesto de manifiesto en linfocitos T mediante técnicas de coimmunoprecipitación y citometría de flujo con anticuerpos específicos (Kameoka et al., 1993; De Meester et al., 1996). Parece ser que ni la actividad adenosina desaminasa ni la dipeptidil peptidasa IV son esenciales para la interacción alostérica de las dos proteínas (Dong et al., 1996; Jeanfavre et al., 1996).

El CD26 (o ADA<sub>bp</sub>) se expresa constitutivamente en una gran variedad de células, principalmente en células epiteliales de intestino, túbulo proximal de riñón, placenta y cerebro (Trotta, 1982; Stein et al., 1989). En linfocitos T su expresión está fuertemente regulada. Así, esta proteína se expresa en baja concentración en linfocitos T de sangre periférica, pero su concentración se incrementa cuando las células T se activan (Fleisher, 1987). La activación de los linfocitos también produce un incremento de la expresión de la actividad ADA de membrana junto con otros marcadores linfocíticos (Martín et al., 1993).

Aunque existen evidencias de que la ADA se une al CD26 en la membrana plasmática, en algunos tejidos de ciertas especies no existe una correlación entre la distribución e interacción de la ADA y su proteína de unión. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que estas dos proteínas no colocalizan en corteza de riñón humano, de ratón, de rata y de conejo, aunque si colocalizan en túbulo proximal de conejo y en uniones corticomedulares (Schrader et al., 1994; Dinjens et al., 1989). En cerebro de conejo el CD26 se concentra en neuronas, mientras que la ADA se expresa principalmente en oligodendroglia y células endoteliales de vasos sanguíneos (Schrader et al., 1987). Sin embargo, el mismo grupo de investigación ha demostrado la colocalización de las dos proteínas en una región muy específica del cerebro de ratón y rata (Nagy et al., 1996).

Mientras que la interacción ADA-CD26 tiene lugar en células de diferentes orígenes, el CD26 murino es incapaz de unir ADA tanto de su propia especie como de las otras. La ADA murina tampoco es capaz de interaccionar con CD26 de las diferentes especies estudiadas. Así, el

CD26 de conejo se une a la ADA de conejo, humana y de mono, mientras que no es capaz de unir ADA murina o de cobaya (Schrader et al., 1990). De la misma manera, el CD26 de ratón no es capaz de unir ADA humana, murina o bovina (Dinjens et al., 1989). La ADA de intestino bovino interacciona con CD26 humano, bovino y de conejo, pero no es capaz de unirse al CD26 porcino (De Meester et al., 1996). Estos resultados hacen pensar que quizás puedan existir otras proteínas, distintas del CD26, que pueden anclar ADA a la membrana plasmática.

#### **2. 2. 4. Función fisiológica de la ecto-adenosina desaminasa**

La función atribuida a la ecto-adenosina desaminasa ha sido la regulación de la concentración extracelular de adenosina. En muchos sistemas biológicos, como el corazón, el riñón, el sistema nervioso y el tejido adiposo, la adenosina extracelular es un modulador que actúa como autocoide al unirse a sus receptores específicos de membrana (apartado 2.4.5; Palmer and Stiles, 1995). La ecto-ADA, junto con los transportadores nucleosídicos, regula la concentración extracelular de adenosina y en última instancia sus efectos sobre el organismo. La adenosina administrada por vía intravenosa es rápidamente eliminada del flujo sanguíneo por los eritrocitos y las células endoteliales vasculares, siendo su vida media en el plasma de 0.6-10 segundos (Belardinelli, 1993). Esas células contienen concentraciones importantes de ecto-ADA (Franco et al., 1990) por lo que, además de ser transportada al interior celular por los transportadores nucleosídicos, la adenosina puede ser degradada en la superficie celular por la ecto-ADA. Dong y colaboradores (1996) utilizando células Jurkat transfectadas con CD26, que expresan mayor cantidad de ecto-ADA, han confirmado que éstas son más resistentes que las células no transfectadas, a la inhibición ejercida por la adenosina en la proliferación celular y la producción de interleuquina-2 inducida por varios estímulos. En linfocitos mediante microscopía electrónica se ha colocalizado la ADA y el CD26 en la superficie celular, pero no en el citosol, lo que sugiere que aunque la ecto-ADA de los linfocitos acabe uniéndose al CD26, éste no actúa como transportador de ADA hacia la superficie (Dong et al., 1996).

En cerebro, se han detectado neuronas inmunoreactivas a ADA (Nagy et al., 1996). Además, en células cerebrales en cultivo (Trams and Lauter, 1975) y sinaptosomas de cerebro de rata (Franco et al., 1986) se ha observado un enriquecimiento similar en las mismas fracciones de ecto-ADA y de ecto-5'-nucleotidasa y diferente a enzimas citosólicas como la lactato deshidrogenasa. La ecto-ADA y el transportador nucleosídico equilibrativo codistribuyen en

zonas concretas del cerebro, lo que parece indicar que el metabolismo y el transporte de la adenosina están íntimamente relacionados (Nagy and Dadonna, 1985). Todos estos datos parecen indicar que una de las funciones de la ecto-ADA es la inactivación de adenosina, la cual es capaz de activar receptores de adenosina pre y post-sinápticos. Por otro lado, la adenosina y sus análogos agonistas ejercen retroinhibición ya que disminuyen la actividad tanto de la 5'-nucleotidasa citosólica como de la ecto-5'-nucleotidasa, a través de la activación del receptor A<sub>1</sub> de adenosina en cardiomiocitos de rata (Kitakaze et al., 1994). Es bien conocido que la interacción ADA/CD26 no modifica la actividad ADA, por lo que la ecto-ADA, anclada al CD26, es totalmente funcional y efectiva para degradar la adenosina extracelular (Dong et al., 1996; Jeanfavre et al., 1996). Todos estos hechos sugieren que los sistemas implicados en el metabolismo y transporte de adenosina extracelular están interrelacionados, regulando la concentración de adenosina y por tanto su efecto fisiológico.

En la última década se ha puesto de manifiesto que, a parte de degradar adenosina, la ecto-ADA puede ejercer otras funciones fisiológicas. Algunos efectos que produce la ecto-ADA independientemente de su actividad catalítica fueron demostrados inicialmente por Catania y colaboradores (1991). En neuronas de cerebelo, la ADA exógena induce movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup> e inosítoles fosfatos. Este efecto no se modifica por agonistas o antagonistas de los receptores de adenosina, pero sí que es antagonizado por antagonistas del receptor de glutamato.

La función extraenzimática de la ecto-ADA se confirmó al establecerse que era una molécula coestimuladora en linfocitos T. El CD26, además de su función como dipeptidil peptidasa IV, es capaz de inducir transducción de señales en algunos sistemas celulares. Esta función del CD26 ha sido estudiada en linfocitos y se ha relacionado con la activación celular. El CD26 es un coestimulador linfocitario (Martín et al., 1995) que por sí sólo no es capaz de inducir la transducción de señal, requiriendo la presencia del TCR-CD3. Entre el TCR-CD3 y el CD26 debe establecerse una interacción todavía no muy estudiada. Por un lado, se ha sugerido que el CD26 interacciona directamente con la cadena  $\zeta$  del TCR-CD3 (Mittrücker et al., 1995), de manera que actúa como estimulador. Por otro lado, el CD26 puede unirse a la fosfotirosina fosfatasa CD45, la cual al interactuar con el TCR-CD3 mediaría la coestimulación del CD26 (Torimoto et al., 1991). Considerando estos hechos, es lógico pensar que la unión de la ADA al CD26 puede intervenir en la función coestimuladora del CD26. Efectivamente, en linfocitos T la adición de ADA exógena, enzimáticamente activa o inhiba, incrementa la proliferación celular

inducida vía el complejo TCR/CD3, mientras que anticuerpos anti-ADA bloquean este efecto (Martín et al., 1995).

También se ha estudiado el papel de la ecto-ADA en estados patológicos como la leucemia y el SIDA. La ecto-ADA y el CD26 pueden ser utilizados como marcadores proliferativos dado que su expresión varía en células con síndromes linfoproliferativos y aumenta paralelamente a la aparición de CD71 (receptor de transferrina y marcador proliferativo) en células T y B estimuladas por mitógenos (Martín et al., 1993, 1995). Recientemente, se ha demostrado que el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), por medio de la proteína de la superficie viral gp120, bloquea la unión de ADA al CD26 en linfocitos T (Valenzuela et al., 1997). La interrupción de la interacción ADA/CD26 por la gp120 bloquea la señal de transducción inducida por la ADA en células T activadas, lo que podría contribuir a la defectiva activación de éstas encontrada en los pacientes de SIDA (Valenzuela et al., 1997).

### **2.3. RECEPTORES PURINÉRGICOS**

Los nucleósidos y nucleótidos de adenina ejercen una gran variedad de efectos fisiológicos en numerosas células. Estos efectos resultan de la activación de receptores de membrana conocidos con el nombre genérico de receptores purinérgicos o purinoreceptores (Windscheif, 1996). La mayoría de estos receptores, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, responden selectivamente a una gran variedad de estímulos extracelulares como hormonas, neurotransmisores, fotones, factores olfativos y feromonas (Helmreich and Hofmann, 1996, revisión). A pesar de su diversidad, los receptores acoplados a proteínas G poseen una considerable homología estructural, que condiciona un mecanismo de acción común (Strader et al., 1994). La señalización se inicia con la unión del ligando-agonista a su receptor específico en la superficie de la célula, lo que provoca un cambio conformacional en el receptor que permite que éste interactúe y active a la proteína G heterotrimérica en la membrana. La proteína G, en esta forma, activa a proteínas efectoras que modulan las concentraciones intracelulares de segundos mensajeros, los cuales transducen la señal y provocan la respuesta fisiológica (apartado 2.4.3). La clonación y secuenciación de unos 250 receptores de esta superfamilia muestra que están compuestos por una cadena polipeptídica que posee siete dominios  $\alpha$  helicoidales hidrofóbicos que atraviesan la membrana celular. Los siete dominios transmembrana están conectados por bucles hidrofílicos extracelulares e intracelulares alternados

(ver estructura del receptor A<sub>1</sub> de adenosina, Figura 5). El extremo aminoterminal se localiza en el espacio extracelular, mientras que el carboxiterminal está en el citosol.

Los receptores acoplados a proteínas G poseen otras características estructurales comunes como la modificación por acetilación con ácidos grasos en un residuo de cisteína y la glicosilación. Todos los receptores clonados hasta la fecha tienen como mínimo una secuencia consenso de N-glicosilación Asn-X-Ser/Thr. En algunos casos la glicosilación es importante para la transducción de la señal (Kaushal et al, 1994). La comparación de las secuencias aminoacídicas y resultados de mutagénesis dirigida han revelado que existen ciertos dominios y aminoácidos conservados en la mayoría de estos receptores involucrados en la estabilización de la estructura, la unión del ligando y la interacción con la proteína G (Baldwin, 1993, 1994). La mayoría de receptores poseen dos cisteínas altamente conservadas en el segundo y tercer dominio extracelular, que podrían formar un puente disulfuro en el 92 % de los receptores y que juega un papel importante en la estabilización de la estructura terciaria del receptor (Baldwin, 1993). Se cree que todos los aminoácidos implicados en la unión del ligando se encuentran situados en las dos terceras partes superiores del dominio transmembrana del receptor (Baldwin, 1994). Parece que los aminoácidos estrictamente conservados juegan un papel esencial en el mantenimiento de la estructura, mientras que los conservados entre subfamilias definen las propiedades funcionales de éstas (Atwood et al., 1991).

### **2. 3. 1. Clasificación de los receptores purinérgicos**

La primera clasificación de los receptores purinérgicos la propuso G. Burnstock (1978), el cual sugirió la existencia de dos tipos de purinoreceptores, denominados P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub>. Esta clasificación estaba basada en cuatro criterios: (a) la potencia relativa del ATP, ADP, AMP y adenosina por estos receptores, (b) la acción de las metilxantinas como antagonistas de los receptores P<sub>1</sub> pero no de los P<sub>2</sub>, (c) la modulación de la adenilato ciclasa por la adenosina pero no por el ATP, y (d) la producción de prostaglandinas por el ATP pero no por la adenosina. De esta manera, durante mucho tiempo se consideraron los receptores purinérgicos P<sub>1</sub> (receptores de adenosina) como aquellos más sensibles a la adenosina y al AMP, antagonizables por las metilxantinas (teofilina y cafeína) y cuya estimulación modulaba la actividad adenilato ciclasa. Por otro lado, los receptores purinérgicos P<sub>2</sub> (receptores de ATP) eran más sensibles al ATP y ADP, su acción no era antagonizada por las metilxantinas y su activación conducía a la



producción de prostaglandinas (Burnstock, 1978). Sin embargo, esta clasificación inicial ha sido extensamente modificada debido a la nueva información estructural y farmacológica disponible. Según la nueva clasificación (Fredholm et al., 1994, 1997), los receptores P1 (receptores de adenosina) corresponden a receptores acoplados a proteínas G y cuyo ligando natural es la adenosina. Los nucleótidos de adenina pueden o no ser agonistas de estos receptores. Las metilxantinas no son antagonistas para todos los subtipos P1 y éstos pueden actuar a través de la adenilato ciclasa, sobre canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  o de  $\text{K}^+$  o sobre fosfolipasas. Por otro lado, los receptores purinérgicos P2 pueden ser receptores acoplados a proteínas G (P2Y) o canales iónicos intrínsecos (P2X) y sus ligandos naturales son nucleótidos (o dinucleótidos) purínicos o pirimidínicos. La adenosina y el AMP no activan a estos receptores y los nucleótidos de adenina pueden modular, a través de los receptores P2, los niveles de  $\text{AMP}_c$ .

Los receptores de tipo P2 incluyen una gran heterogeneidad de receptores, por lo que se han clasificado en dos grupos según su estructura: P2X (canales iónicos intrínsecos) y P2Y (receptores acoplados a proteína G) (Fredholm et al, 1994, 1997). El primer grupo lo forman los receptores: P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub> y P2X<sub>7</sub>. Estos receptores son canales iónicos de ATP formados por un gran dominio extracelular y dos dominios transmembrana hidrofóbicos. Además, contienen un segmento hidrofóbico que forma el poro y el sitio de unión del ión. Los receptores P2X son multiméricos, de manera que sus subunidades se pueden unir para formar homo o heterodímeros (Lewis et al., 1995). Los receptores P2X<sub>1</sub>, son canales iónicos permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y están ampliamente distribuidos en musculatura lisa, cerebro, corazón y timo (Bean, 1992). En células de musculatura lisa de vasos sanguíneos el ATP actúa sobre los receptores P2X<sub>1</sub> provocando contracción y por tanto vasoconstricción (Kennedy et al., 1985). El receptor P2X<sub>2</sub> es un canal permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y se expresa principalmente en pituitaria, vaso deferente, médula espinal, vejiga urinaria y cerebro (Brake et al., 1994). El receptor P2X<sub>3</sub> es un canal catiónico no selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  y se expresa únicamente en las neuronas sensoriales (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995). El receptor P2X<sub>4</sub> se expresa en numerosas áreas del cerebro y en tejidos endocrinos, tales como el páncreas, los ovarios, los testículos, las glándulas adrenales y la pituitaria (Wang et al., 1996). Este canal es permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  y en menor medida al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  (Buell et al., 1996). Los P2X<sub>5</sub> y P2X<sub>6</sub> son los receptores P2 que se expresan en niveles más bajos. El P2X<sub>6</sub> es, junto con el P2X<sub>4</sub>, el que se expresa más abundantemente en cerebro (Collo et al., 1996). El receptor P2X<sub>7</sub> es activado por  $\text{ATP}^{4-}$  y parece ser un poro no selectivo de

$\text{Ca}^{2+}$ . Se encuentra en células sanguíneas donde está implicado en la respuesta inflamatoria (Osipchuk and Cahalan, 1992).

El segundo grupo de receptores P2, los P2Y, son receptores acoplados a proteínas G. Este grupo está formado por los receptores: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>3</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>5</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>7</sub>, P2Y<sub>ADP</sub> y P2Y<sub>Ap4A</sub>. El receptor P2Y<sub>1</sub> es activado por ATP pero no por UTP. El ATP, a través del receptor P2Y<sub>1</sub>, estimula la fosfolipasa C, aumenta los niveles de ácido araquidónico e inhibe la formación de AMP<sub>c</sub> (O'Connor et al., 1991; Yamada et al., 1992). El ATP actúa sobre estos receptores en las células endoteliales de los vasos sanguíneos o directamente en la musculatura lisa vascular produciendo relajación y por tanto vasodilatación (De May and Vanhoutte, 1981; Keef et al., 1992). Los receptores P2Y<sub>1</sub> también se expresan en eritrocitos y plaquetas no humanas, cerebro e hígado de rata (Boyer et al., 1990). El receptor P2Y<sub>2</sub> es activado por ATP y UTP (O'Connor et al., 1991; Cusack, 1993). Se ha localizado en numerosas líneas celulares y en neutrófilos humanos, donde estimula la hidrólisis de fosfatidil inosítoles y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Garritsen et al., 1992; Dalziel and Westfall, 1994). El receptor P2Y<sub>3</sub> tiene preferencia por nucleótidos difosfatos, con un orden de potencia UDP>ADP>ATP. Este receptor media la movilización de calcio intracelular (Webb et al., 1996a). El receptor P2Y<sub>4</sub> es activado específicamente por UTP y UDP pero no por ATP o ADP. La activación de este receptor incrementa la hidrólisis de inositol fosfatos y la movilización de calcio (Nguyen et al., 1995). El receptor P2Y<sub>5</sub> presenta gran afinidad por ATP y menor por ADP. En gallina este receptor está casi ausente en cerebro, hígado y células sanguíneas, mientras que su expresión aumenta en linfocitos T activados (Webb et al., 1996b). El receptor P2Y<sub>6</sub> tiene gran afinidad por UDP, menor para UTP y no une ATP. Este receptor se detecta en pulmón, placenta, timo, intestino y linfocitos (Communi et al., 1996). El receptor P2Y<sub>7</sub> tiene gran afinidad por ATP y mucha menor por UTP y ADP. Se expresa de forma abundante en corazón y músculo esquelético y moderadamente en cerebro e hígado. El receptor P2Y<sub>7</sub> parece regular la contracción muscular cardíaca (Akbar et al., 1996). El receptor P2Y<sub>ADP</sub> es un receptor acoplado a proteína G, activado por ADP y antagonizado por ATP (Humphries et al., 1993). Se expresa en plaquetas y su activación por ADP provoca la inhibición de la adenilato ciclasa y la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca la agregación plaquetaria. Por último, el P2Y<sub>Ap4A</sub> es el receptor de diadenosina tetrafosfato (Ap<sub>4</sub>A) y diadenosina pentafosfato (Ap<sub>5</sub>A) en sinaptosomas y células cromafines. Este receptor es insensible a ATP, moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  y está regulado por fosforilación/defosforilación (Hilderman et al., 1991; Castro et al., 1992; Pintor et al., 1997a).

## 2. 3. 2. Receptores de adenosina

La adenosina produce una gran variedad de efectos fisiológicos en el organismo a través de la activación de sus receptores específicos de membrana. Los receptores de adenosina (purinoreceptores P1) pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Los receptores de adenosina han sido clasificados en cuatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, según el orden de potencia en la unión de ligandos y la señal desencadenada tras su activación (Fredholm et al., 1997). La clonación de estos receptores ha aumentado el conocimiento de su estructura, ha facilitado su clasificación y ha permitido un mejor conocimiento de su función y regulación.

Inicialmente los receptores de adenosina se clasificaron según la capacidad que tenía la adenosina de activar o inhibir a la enzima adenilato ciclasa. De este modo, se designó a los receptores cuya activación provocaba la inhibición o activación de la adenilato ciclasa como receptor de adenosina A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>, respectivamente (Van Calker et al., 1979; Londos et al., 1980). Sin embargo, la adenosina además de modificar la concentración de AMP<sub>c</sub> actúa sobre otros sistemas de segundos mensajeros. Por este motivo, la actual clasificación de los diferentes subtipos de receptores de adenosina (Tabla 1) está basada en las afinidades relativas de una serie de agonistas y antagonistas, en la potencia relativa de los agonistas en la formación de segundos mensajeros y en la información estructural disponible.

Los principales análogos agonistas utilizados para la clasificación farmacológica de estos receptores son la adenosina, R-PIA, S-PIA, CHA, NECA, CADO y CGS21680. El orden de potencia funcional y de unión de estos análogos a los diferentes subtipos de receptores de adenosina en la mayoría de tejidos son:

A<sub>1</sub>: R-PIA, CHA > NECA, CADO > Adenosina ≥ S-PIA > CGS21680

A<sub>2A</sub>: NECA, CGS21680, Adenosina > CADO, R-PIA > CHA, S-PIA

A<sub>2B</sub>: NECA > CADO, R-PIA > Adenosina > S-PIA > CGS21680

A<sub>3</sub>: APNEA, N<sup>6</sup>-benzyl-NECA > NECA, R-PIA > CGS21680 > Adenosina

Subtipo	A <sub>1</sub>	A <sub>2A</sub>	A <sub>2B</sub>	A <sub>3</sub>
<b>Proteína G acoplada</b>	G <sub>i(1-3)</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub>	??
<b>Efectores acoplados</b>	↓ AMP <sub>c</sub> ↑ IP <sub>3</sub> ↓ δ ↑ Ca <sup>2+</sup> ↑ K <sup>+</sup>	↑ AMP <sub>c</sub>	↑ AMP <sub>c</sub>	↓ AMP <sub>c</sub>
<b>Agonistas</b>	<u>Alta</u> (0.3-3nM): CPA, CHA, R-PIA <u>Intermedia</u> (3-30 nM): NECA, CADO, Ado <u>Baja</u> (30nM->1μM):S-PIA, CV1808, CGS21680	<u>Alta</u> (1-20nM): NECA, CGS21680, Ado <u>Intermedia</u> (20-200nM): CADO, CV1808, R-PIA <u>Baja</u> (200-500 nM): CPA, CHA, S-PIA	<u>Alta</u> (0.5-5μM): NECA <u>Intermedia</u> (5-20μM): 2-CADO, Ado, R-PIA <u>Baja</u> (20->100μM):S-PIA, CGS21680, CV1808	<u>Alta</u> (<10nM): N <sup>6</sup> -benzyl-NECA APNEA, <u>Intermedia</u> (10-30nM):NECA,R-PIA <u>Baja</u> (100->1μM): CGS21680, Ado
<b>Antagonistas</b>	<u>Alta</u> (0.5-2nM): DPCPX, XAC <u>Intermedia</u> (2-200nM): CPT, 8-PT <u>Baja</u> (1->20μM):8-pSPT, Teofilina, Cafeína, DMPX, KF17837	<u>Alta</u> (20-100nM): XAC, KF17837 <u>Intermedia</u> (0.2-2μM): CPT, DPCPX, 8-PT <u>Baja</u> (2->20μM): DMPX, 8-pSPT, Teofilina, Cafeína	<u>Alta</u> (20-100 nM): XAC, DPCPX, 8-PT <u>Intermedia</u> (0.5-10μM): 8-pSPT <u>Baja</u> (10->20μM): DMPX, Teofilina, Cafeína, KF17837	<u>Alta</u> (1-20 nM): BW-A 522
<b>Distribución tisular</b>	Cerebro (corteza, hipocampo, cerebelo, estriado), testículo, riñón, tejido adiposo, corazón.	Cerebro (estriado, núcleo acumbens, tubérculo olfatorio), corazón, pulmón, timo.	Alta en tracto gastrointestinal	Testículo

**Tabla 1. Clasificación, ligandos, sistemas efectores acoplados y distribución tisular de los receptores de adenosina (Fredholm et al., 1994).**

Si bien esta clasificación es general, pueden existir diferencias en la unión de algunos ligandos a un mismo subtipo de receptor como consecuencia de diferencias en la secuencia de aminoácidos del receptor en las diferentes especies (Stone et al., 1988; Fredholm, 1995).

En experimentos de unión, el radio de potencia estereoisomérico R/S de la PIA es mayor que diez para el subtipo  $A_1$  y menor que diez para el  $A_2$ . Este hecho se ha utilizado con asiduidad para distinguir estos dos subtipos de receptores de adenosina (Paton and Kurahashi, 1981). Aunque ambos subtipos de receptor de adenosina  $A_2$  ( $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ) estimulan la actividad adenilato ciclasa (Bruns et al., 1986), su distribución tisular (Stehle et al., 1992) y el orden de afinidad de los agonistas (Gurden et al., 1993) es diferente. Así, los agonistas CV1808, CGS21680 y NECA tienen una alta y similar afinidad por el receptor  $A_{2A}$  en estriado de rata, arterias coronarias caninas, neutrófilos y plaquetas humanas (Jarvis et al., 1989). Por el contrario, la NECA es más efectiva que el CV1808 y el CGS21680 en fibroblastos y aorta donde se expresa el subtipo  $A_{2B}$  (Gurden et al., 1993). El receptor  $A_{2B}$  se expresa en colon, pulmón, médula espinal, ojo, vejiga urinaria y útero (Stehle et al., 1992; Dixon et al., 1996). En los últimos años se han sintetizado una serie de agonistas altamente selectivos para el receptor  $A_{2A}$  y que no actúan sobre el  $A_{2B}$  o el  $A_1$ . Así, el PAPA-APEC, el *m*- y *p*-fenileno-diisotiocianato (DITC)-APEC (Hide et al., 1992) y algunos derivados de la NECA (Cristalli, et al., 1995) han sido utilizados, junto con el CGS21680, en experimentos de unión para caracterizar este subtipo de receptor. Para el receptor  $A_{2B}$  no existe un ligando específico lo que ha hecho que este sea el subtipo de receptor de adenosina menos estudiado.

Aunque han sido sintetizados un gran número de antagonistas selectivos para el receptor  $A_1$  (apartado 2. 4. 2), no ha ocurrido lo mismo para el resto de receptores de adenosina. En general, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  tienen una afinidad mucho menor por los derivados de xantinas que el receptor  $A_1$ ; sin embargo, recientemente se ha sintetizado el derivado de xantina KF17837, y el no derivado de xantina CP66713, los cuales actúan como antagonistas selectivos del receptor  $A_{2A}$  (Sarges et al., 1990; Nonaka et al., 1994). Muy recientemente, el compuesto no derivado de xantina SCH-58261 se ha utilizado como potente ( $K_d \approx 1-2$  nM) y selectivo antagonista en la caracterización farmacológica y la inhibición funcional del receptor  $A_{2A}$  de plaquetas, de estriado, de arterias coronarias y de células PC12 (Belardinelli, et al, 1996; Zocchi et al., 1996). Para el receptor  $A_{2B}$  el único antagonista con moderada afinidad ( $K_d \approx 0.5\mu\text{M}$ ) es el DPCPX.

Aunque el receptor  $A_3$  ha sido el de caracterización molecular más reciente, ya se han sintetizado un gran número de agonistas y antagonistas de alta afinidad y selectividad. Los agonistas ABMECA, APNEA y  $N^6$ -benzyl-NECA y el antagonista ABOPX muestran una buena afinidad pero no son totalmente selectivos para este receptor (Olah et al., 1994a; Linden, 1994). El agonista Cl-IBMECA y el antagonista MRS1191 son bastante selectivos para el receptor  $A_3$  con respecto al  $A_1$  (Dunwiddie et al., 1997) y los derivados de flavonoides poseen una alta afinidad por el receptor  $A_3$  aunque la selectividad es baja (Karton et al., 1996).

En cuanto a la funcionalidad de los distintos subtipos de receptores de adenosina cabe destacar que el receptor  $A_1$  induce una gran variedad de respuestas celulares, tales como la inhibición de la adenilato ciclasa, aumento de la conductancia de  $K^+$ , disminución de la conductancia de  $Ca^{2+}$  y activación de la fosfolipasa C (apartado 2. 4. 3; Linden, 1991). Por el contrario, los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  parecen estar acoplados a un número mucho menor de sistemas efectores. Ambos receptores están positivamente acoplados a la adenilato ciclasa a través de la proteína  $G_s$  (Daly et al., 1983). En los nervios periféricos los agonistas no selectivos de estos dos receptores aumentan la hidrólisis de fosfatidilinositoles (Sheldon et al., 1996) y en células leucémicas Jurkat se ha descrito la presencia del subtipo  $A_{2B}$ , el cual es el responsable de la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular (Mirabet et al., 1997). Los receptores  $A_3$  inhiben la actividad adenilato ciclasa cuando se expresan en células CHO a través de una proteína  $G_i$  (Zhou et al., 1992; Hill et al., 1997). En eosinófilos humanos y células derivadas de mastocitos de rata BL-2H3, la activación del receptor  $A_3$  activa la fosfolipasa C, lo que incrementa la liberación de  $Ca^{2+}$  de reservorios intracelulares (Kohno et al., 1996; Shin et al., 1997).

La clasificación de los cuatro receptores de adenosina se ha ratificado al clonarse cada uno de ellos. La clonación del receptor  $A_1$  (apartado 2. 4. 1),  $A_{2A}$  (Maenhaut et al., 1990; Furlong et al., 1992),  $A_{2B}$  (Stehle et al., 1992; Pierce et al., 1992; Rivkees and Reppert, 1992) y  $A_3$  (Zhou et al., 1992; Linden et al., 1993; Salvatore et al., 1993; Hill et al., 1997) confirman los estudios farmacológicos de unión de ligandos y su funcionalidad. La clonación y secuenciación de estos receptores han mostrado que poseen características estructurales comunes a todos los receptores de la familia de receptores acoplados a proteínas G (apartado 2. 3).

Por otro lado se ha propuesto un nuevo subtipo de receptor de adenosina, el  $A_4$ , encontrado en estriado y células de musculatura lisa de arterias coronarias, el cual parece aumentar la conductancia de  $K^+$  (Cornfield et al., 1992). Estudios posteriores sugieren que este nuevo centro de unión es el receptor  $A_{2A}$  y que las diferencias farmacológicas descritas se deben

a las condiciones específicas del ensayo (Luthin and Linden, 1995), por lo que la existencia de este receptor  $A_4$  ha sido totalmente descartada (Fredholm et al., 1997).

Los tejidos de mamíferos contienen una serie de proteínas que unen análogos de adenosina pero con características farmacológicas distintas a los receptores de adenosina. Estas proteínas localizadas en el citosol y/o en la membrana celular, se caracterizan porque (1) unen el agonista no selectivo NECA, (2) no están acopladas a proteínas G, y (3) no estimulan a la adenilato ciclasa. Las proteínas que actúan como centros de unión de adenosina de baja afinidad se denominan: *adenotina 1* (Hutchison and Fox, 1989; Fein et al., 1994) y *adenotina 2* (Lorenzen et al., 1996a). Estas dos proteínas se diferencian de los receptores de adenosina porque no unen los derivados de adenosina  $N^6$ -sustituidos ni las xantinas (Fein et al., 1994). Otra proteína de unión de adenosina hallada en membranas de estriado y corteza cerebral bovina es la denominada  $A_x$ . Esta proteína se distingue de la adenotina porque tiene una alta afinidad por la adenosina, inosina y nucleótidos de adenina (Lorenzen et al., 1993a). Estos centros de unión de adenosina coexisten en los tejidos estudiados con los receptores  $A_1$  y  $A_2$  aunque su significado fisiológico está aun por elucidar.

## **2. 4. RECEPTOR $A_1$ DE ADENOSINA**

### **2. 4. 1. Caracterización molecular del receptor $A_1$**

La estructura y características moleculares del receptor  $A_1$  de adenosina han sido estudiadas mediante tres técnicas complementarias: (1) la unión covalente al receptor de ligandos marcados (*crosslinking* y fotoafinidad), (2) la purificación del receptor a homogeneidad, y (3) la clonación, secuenciación y expresión del receptor de varias especies.

Se ha fotomarcado el receptor  $A_1$  de varios tejidos y especies mediante la unión de radioligandos agonistas y antagonistas (Klotz et al., 1985; Barrington et al., 1989; Ciruela et al., 1995). El análisis posterior mediante electroforesis con geles de poliacrilamida del receptor fotomarcado muestra que tiene un peso molecular entre 34-39 kDa, según la especie. Así ocurre con el receptor  $A_1$  de cerebro de rata (34 kDa, Nakata, 1992), humano (35 kDa, Nakata, 1992), de buey (37 kDa, Olah et al., 1990) o de cerdo (39 kDa, Ciruela et al., 1995). El receptor  $A_1$  de cerebro es una glicoproteína que contiene una única cadena de carbohidratos de tipo complejo (Stiles, 1986; Olah et al., 1990). Las ligeras diferencias en el peso molecular entre las diferentes

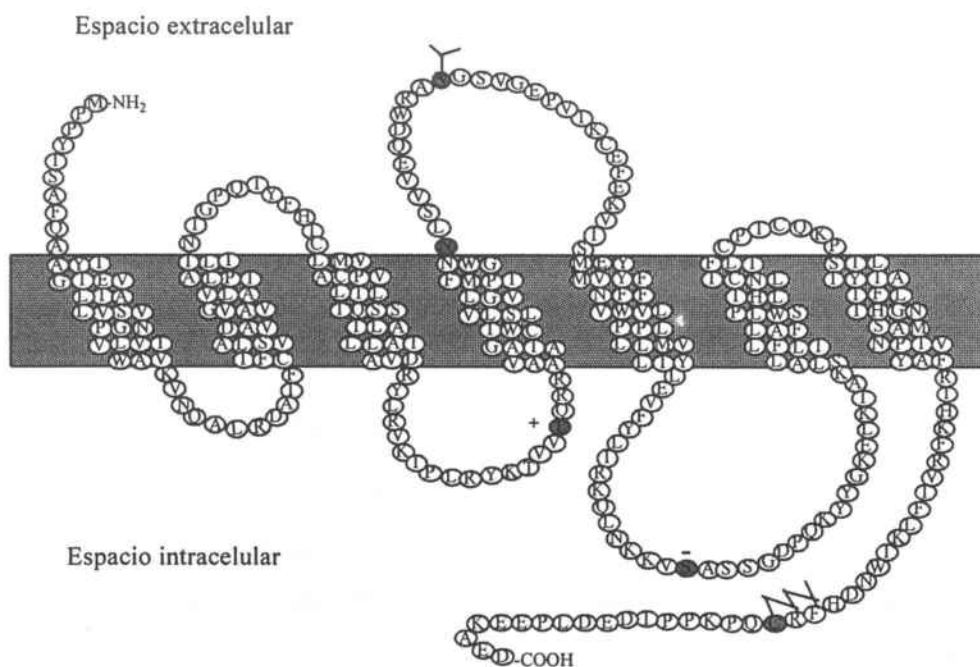
especies pueden ser debidas a diferencias en el grado de glicosilación del receptor, ya que el tratamiento del receptor con glicosidasas incrementa su movilidad electroforética hasta el peso molecular correspondiente a 32 kDa (Stiles, 1986).

El receptor  $A_1$  ha sido purificado a homogeneidad mediante columnas de afinidad con ligandos agonistas (Munshi and Linden, 1989) o antagonistas (Olah et al., 1990; Nakata, 1992). La purificación del receptor de cerebro bovino con columnas de afinidad con agonistas dió lugar a la copurificación del receptor junto con diferentes proteínas G ( $G_{\alpha 0}$ ,  $G_{\alpha 1}$ ,  $G_{\alpha 2}$ ,  $G_{\beta 35}$  y  $G_{\beta 36}$ ) (Munshi and Linden, 1989; Munshi et al., 1991). Por el contrario, la purificación con columnas acopladas a antagonistas no permite la copurificación (Nakata, 1992), lo que confirma que, al contrario que el agonista, el antagonista no estabiliza los complejos receptor-proteína G. La reconstitución en vesículas del receptor purificado muestra que éste mantiene sus características farmacológicas y su capacidad de activar proteínas G (Freissmuth et al., 1991; Munshi et al., 1991).

La clonación, secuenciación y expresión del receptor  $A_1$  de varias especies como perro (Libert et al., 1991), rata (Mahan et al., 1991), conejo (Hill et al., 1997), buey (Olah et al., 1992), ave (Aguilar et al., 1995) y humano (Libert et al., 1992), ha permitido un mejor conocimiento de la estructura, de los aminoácidos implicados en el reconocimiento del ligando y de los procesos implicados en su regulación. Los cDNAs de los receptores  $A_1$  clonados codifican una proteína de 326 aminoácidos y de peso molecular 36 kDa (Figura 5). La comparación de las secuencias aminoacídicas del receptor de las diferentes especies indica que existe una identidad mayor al 90% en mamíferos (Ren and Stiles, 1994a). La secuencia aminoacídica muestra una topología similar al resto de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembrana de 22-25 residuos hidrofóbicos, conectados por 3 bucles extracelulares y 3 intracelulares. Presenta un sitio consenso de palmitoilación en el extremo carboxi terminal y sitios consenso de fosforilación para la PKA y la PKC (Figura 5; Olah et al., 1992). Sin embargo, el receptor  $A_1$  presenta unas características inusuales respecto a otros receptores acoplados a proteínas G (Jacobson et al., 1993; Ren and Stiles, 1994a).

El receptor  $A_1$  tiene un peso molecular relativamente bajo (36 kDa) comparado con el resto de receptores acoplados a proteína G ( $\approx$  60 kDa). El tercer dominio intracelular, que se cree implicado en la interacción con la proteína G (Ostrowski et al., 1992), es más corto (34 aminoácidos) que el de otros receptores (140 - 180 aminoácidos). El receptor  $A_1$  posee un único





**Figura 5. Secuencia aminoacídica y estructura del receptor A<sub>1</sub> de adenosina de rata.**

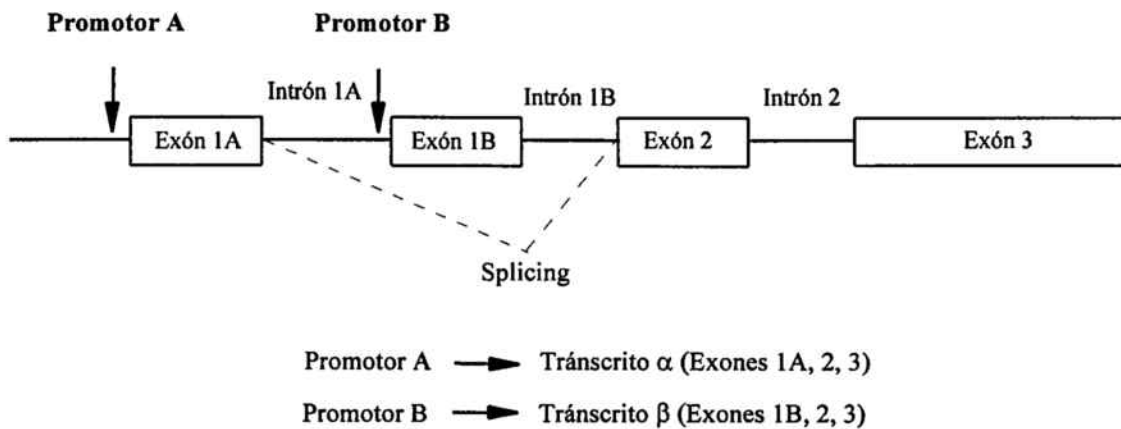
En la figura se muestra un sitio consenso de glicosilación (segundo bucle extracelular), palmitoilación (extremo carboxi terminal) y fosforilación por PKC (+) y PKA (-) (Stiles, 1992).

sitio de N-glicosilación (Asn<sup>159</sup>) en el segundo bucle extracelular, mientras que la mayoría de receptores acoplados a proteínas G presentan también puntos de N-glicosilación en el extremo amino terminal. El receptor A<sub>1</sub> contiene dos residuos de cisteína (Cys106 y Cys190) altamente conservados en la secuencia de la mayoría de receptores de siete dominios transmembrana (Olah et al., 1992). El puente disulfuro que se crea entre estas dos cisteínas es importante para mantener la integridad del sitio de unión del ligando, aunque no formen parte del mismo. La modificación química de cisteínas con agentes como la N-etilmaleimida (NEM), provocan la pérdida de afinidad del receptor por los agonistas (Allende et al., 1991), lo que indica que los enlaces disulfuro están involucrados en el mantenimiento de la estructura del receptor. La secuencia del receptor A<sub>1</sub> también contiene dos histidinas, His 251 y His 278, altamente conservadas en los dominios transmembrana 6 y 7, respectivamente. Estas son las únicas histidinas presentes en la región transmembrana del receptor y se cree que participan en la unión del ligando. Mediante mutagénesis dirigida se ha observado que la mutación de la His 251 disminuye la afinidad del

antagonista sin afectar a la del agonista y disminuye el número de sitios de unión de ambos. Por otro lado, la mutación de la His 278 provoca una pérdida del 90% de la capacidad de unión del agonista y antagonista (Olah et al., 1992). Estos resultados coinciden con los previamente obtenidos con el empleo de reactivos específicos para la histidina, lo que pone de manifiesto la importancia de estos residuos en la unión del ligando (Klotz et al., 1988; Allende et al., 1992).

Mediante mutagénesis dirigida y la expresión de receptores quiméricos se ha puesto en evidencia la importancia de las cuatro primeras regiones transmembrana (TM) del receptor en la unión del ligando, si bien la tercera región no parecen tener un papel significativo en la unión del antagonista (Olah et al., 1994b; Rivkees et al., 1995b). Concretamente los residuos ácidos Glu 16 (TM1) y Asp 55 (TM2) tienen un papel importante en la unión del agonista, mientras que el residuo hidroxilo de la Ser 94 (TM3) es importante para la unión del agonista y antagonista (Barbhaiya et al., 1996). El Asp 55 (TM2) es el responsable de la regulación alostérica de la unión del ligando ejercida por el  $\text{Na}^+$  y la Thr 277 (TM7) está implicada en la unión de agonistas derivados de adenosina 5'-sustituidos en el anillo de la ribosa (Townsend-Nicholson and Schofield, 1994). A diferencia de los receptores de otros neurotransmisores pequeños, en los que se han identificado únicamente las regiones transmembrana como las responsables de la unión del ligando, en el receptor de adenosina  $\text{A}_1$  una región de 11 aminoácidos del extremo carboxi terminal del segundo dominio extracelular parece estar involucrada también en la unión del agonista y del antagonista (Olah et al., 1994b). El conjunto de estos resultados indican que existen múltiples regiones del receptor  $\text{A}_1$  involucradas en el reconocimiento del ligando.

Los dominios del receptor  $\text{A}_1$  que participan en la interacción con la proteína G todavía no han sido identificados. Sin embargo, para otros receptores acoplados a proteínas G se ha puesto de manifiesto la importancia del segundo y tercer bucle intracelular y de la cola carboxi terminal en esa interacción (Baldwin, 1994; Helmreich and Hofmann, 1996). La unión de ligandos a receptores quiméricos  $\text{A}_1/\text{A}_{2A}$  ha mostrado que la región amino terminal del tercer bucle intracelular y los aminoácidos en el dominio carboxi terminal del segundo bucle intracelular del receptor  $\text{A}_{2A}$  parecen tener un papel dominante en la especificidad del acoplamiento con la proteína G, mientras que la cola carboxi terminal no parece estar involucrada en esa interacción (Olah, 1997).



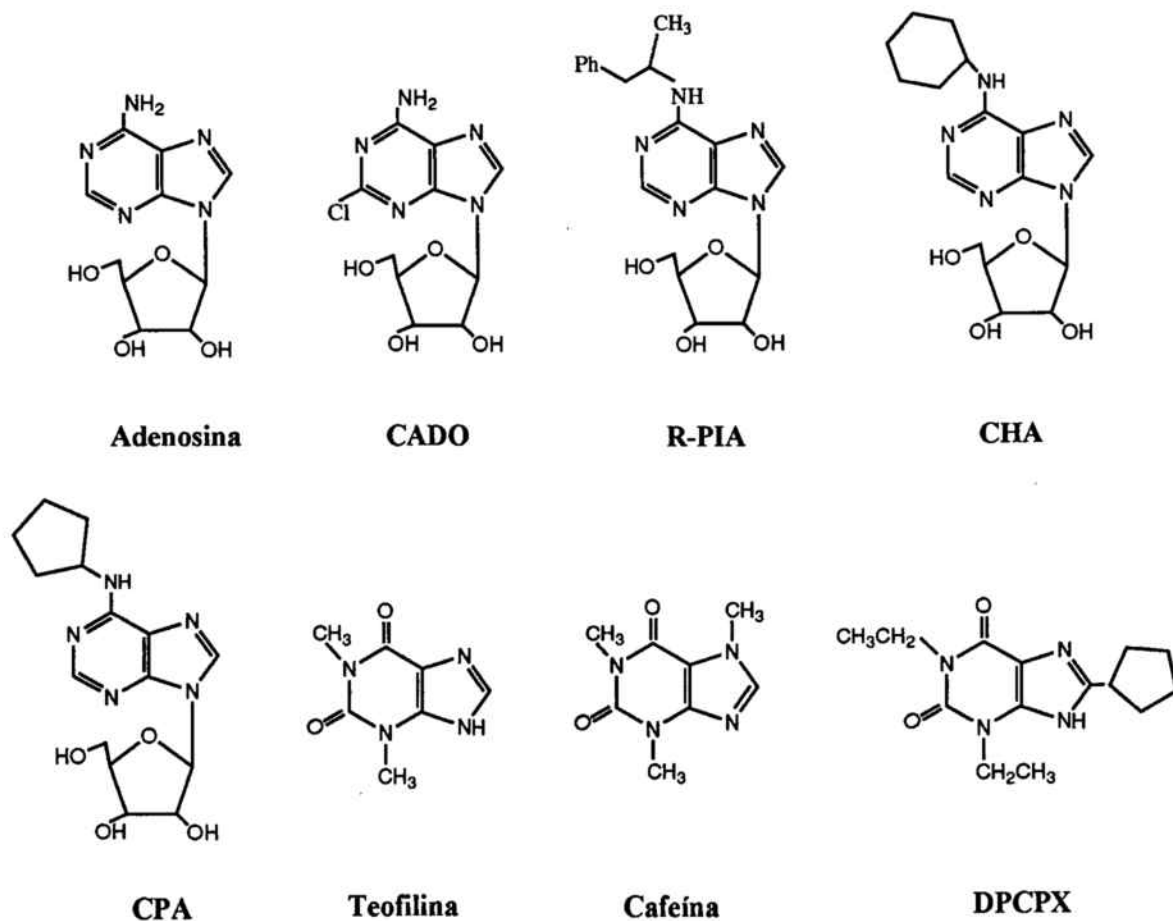
**Figura 6. Estructura del gen humano del receptor A<sub>1</sub> de adenosina (Ren and Stiles, 1995).**

El gen humano del receptor A<sub>1</sub> está localizado en el cromosoma 1 y está formado por cuatro exones y tres intrones (Figura 6; Deckert et al., 1995; Ren and Stiles, 1995; Rivkees et al., 1995a). El análisis de mRNA de distintos tejidos humanos ha mostrado que existen dos tráncritos del receptor A<sub>1</sub>: α y β, generados por activación de dos promotores independientes: A y B. La transcripción desde el promotor A implica un procesamiento alternativo, generándose el tráncrito α, mientras que a partir del promotor B se obtiene el tráncrito β. Los dos tráncritos del receptor A<sub>1</sub> presentan una distribución diferenciada y únicamente un número limitado de tejidos contienen ambos tráncritos. Todos los tejidos examinados (cerebelo, corteza cerebral, riñón, testículos, corazón, tejido adiposo y músculo esquelético) contienen el tráncrito β, mientras que el tráncrito α está presente en tejidos típicamente asociados a una alta expresión del receptor A<sub>1</sub> (cerebro y testículo) (Ren and Stiles, 1994a). Precisamente, la presencia del tráncrito α en el cerebro y testículo permite mayor expresión del receptor A<sub>1</sub> en estos tejidos. Si bien en células COS-7 transfectadas con el gen humano del receptor A<sub>1</sub>, las concentraciones de los dos tráncritos son equivalentes, la expresión del producto génico del tráncrito β es inferior a la del tráncrito α (Ren and Stiles, 1994b). La presencia en el tráncrito β de dos codones ATG, situados *upstream* respecto al inicio de traducción y que actúan reprimiendo la expresión del receptor A<sub>1</sub>, serían los responsables de la menor expresión traduccional de este tráncrito (Ren and Stiles, 1994b).

## 2. 4. 2. Caracterización cinética del receptor A<sub>1</sub>

La caracterización cinética de los receptores de adenosina ha sido ampliamente estudiada gracias al desarrollo de numerosos radioligandos agonistas y antagonistas derivados de la adenosina. Estos compuestos mantienen las mismas características de unión y funcionalidad (para el caso de los agonistas) del ligando natural, pero poseen mayor estabilidad, afinidad y selectividad que la adenosina. Si bien la propia adenosina fue utilizada inicialmente en estudios de unión a los receptores de adenosina (Schwabe et al., 1979), esta molécula no es el mejor ligando debido a su baja afinidad y selectividad, así como su baja estabilidad, ya que la adenosina puede ser metabolizada por la adenosina desaminasa, la S-adenosilhomocisteína hidrolasa, la adenosina quinasa o unirse a otros centros de unión como los transportadores nucleosídicos o la adenotina.

Todos los agonistas de la adenosina son derivados de este nucleósido con sustituciones o modificaciones en las posiciones 5' de la ribosa, en el N de la posición 6 (N<sup>6</sup>) y/o el C de la posición 2 (C<sup>2</sup>) del anillo purínico (véase la Figura 7). La ribosa en la posición N9 de la adenina es esencial para una alta afinidad y actividad intrínseca de los ligandos agonistas del receptor A<sub>1</sub> y en general del resto de receptores de adenosina. Respecto a la ribosa sólo están permitidas pequeñas modificaciones en este grupo para conservar la potencia y la actividad como agonista. La 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA), agonista no selectivo, y el 5'-cloro-5'-deoxiadenosina, agonista potente y selectivo del receptor A<sub>1</sub> son ejemplos de estos ligandos (Daly and Padgett, 1992). La presencia del grupo amino en la posición 6 de la adenosina es esencial para su actividad como agonista. Su sustitución por un grupo metilo, cloruro o hidroxilo da lugar a compuestos inactivos (Bruns et al., 1980). En concreto, el grupo N-H es esencial como dador de H en la unión con el receptor; los derivados N,N-disustituidos son inactivos, mientras que la monosustitución del grupo amino rinde generalmente agonistas potentes y selectivos del receptor A<sub>1</sub>. Los derivados N<sup>6</sup>-alquil o arilalquil aumentan la afinidad y selectividad por el receptor A<sub>1</sub>. La N<sup>6</sup>-(R)-fenilisopropiladenosina (R-PIA) es un agonista potente (K<sub>d</sub> ≈ 0.5-1.5 nM) y selectivo (100 veces) del receptor A<sub>1</sub> y unas 30-40 veces más estereoselectivo respecto a la configuración S (Schwabe and Trost, 1980). Los N<sup>6</sup>-cicloalquil sustituidos como el N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina (CPA, K<sub>d</sub> ≈ 0.5 nM) y el N<sup>6</sup>-ciclohexiladenosina (CHA, K<sub>d</sub> ≈ 0.5-1.5 nM) son 800 y 400 veces más selectivos, respectivamente, por el subtipo A<sub>1</sub> que por el A<sub>2A</sub> (Moos et al., 1985).



**Figura 7. Estructuras de algunos agonistas y antagonistas del receptor  $A_1$  de adenosina.**

Las  $N^6$ -biscicloalquiladenosinas, como la S-ENBA, son aun más selectivas (4700 veces) por el subtipo  $A_1$  (Trivedi et al., 1989). Los derivados de adenosina con sustituciones en  $C^2$  han sido menos utilizados debido a su peor afinidad y poca selectividad por el receptor  $A_1$ . La 2-cloroadenosina (CADO) presenta poca afinidad por el receptor  $A_1$  ( $K_d \approx 6-10$  nM) y es únicamente siete veces más selectivo por ese receptor que por el  $A_2$  (Williams and Risley, 1980). La sustitución combinada en las posiciones  $N^6$  y  $C^2$  o  $N^6$  y  $5'$  producen agonistas más afines y selectivos por el receptor  $A_1$ . El 2-cloro- $N^6$ -ciclopentiladenosina (CCPA) es dos veces más afín y unas 1500 veces más selectivo que el CPA (Lohse et al., 1988). Algunos derivados  $N^6$ -cicloalquil sustituidos de 2-hidroxiadenosina (isoguanosina) muestran una alta afinidad y gran selectividad por el receptor  $A_1$  (Nair et al., 1991). Para el receptor  $A_1$ , la afinidad de unión depende de las interacciones de los dominios  $N^6$  y  $5'$ . Así, mientras que la doble sustitución en las posiciones  $C^2$  y  $5'$  produce agonistas selectivos para el  $A_2$ , como el CGS21680 (Hutchinson et al., 1990), la

disustitución en N<sup>6</sup> y 5' produce compuestos más afines y selectivos para el receptor A<sub>1</sub>. Por ejemplo, el derivado 5'-cloro del agonista S-ENBA es uno de los compuestos más potentes (K<sub>i</sub> ≈ 0.24 nM) y selectivos (16000 veces) de este receptor A<sub>1</sub> (Trivedi et al., 1989).

Las xantinas naturales cafeína (1,3,7-trimetilxantina) y teofilina (1,3-dimetilxantina) fueron los primeros ligandos antagonistas estudiados de los receptores de adenosina (Figura 7; Sattin and Rall, 1970). Las xantinas naturales poseen baja selectividad y muy poca afinidad (del orden de micromolar) por los receptores de adenosina, además de actuar como inhibidores de fosfodiesterasas (Williams et al., 1989).

Se han sintetizado numerosos derivados de xantina con sustituciones en las posiciones 1, 3, 7, 8 y 9 y se han evaluado como antagonistas de los receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2A</sub> (Müller and Scior, 1993, revisión). La sustitución en la posición 3 y 1 de la xantina conduce a derivados de la teofilina con mayor afinidad por el receptor A<sub>1</sub> frente al A<sub>2A</sub>, siendo óptimo para este fin la introducción de un grupo propilo. La introducción de grupos hidrofóbicos (fenil, ciclopentil o ciclohexil) en la posición 8 aumenta también la selectividad y afinidad de los antagonistas por el receptor A<sub>1</sub>. Algunos ligandos con sustituciones en estas posiciones son: el 8-PT, diez veces más potente que la teofilina; el 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX) es una antagonista muy selectiva (700 veces) y de elevada afinidad (K<sub>d</sub> ≈ 0.5 nM) para el receptor A<sub>1</sub> (Lohse et al., 1987); el derivado amida de la xantina XAC muestra una elevada afinidad (K<sub>d</sub> ≈ 1 nM) por el receptor A<sub>1</sub> pero una baja selectividad (Jacobson et al., 1986); derivados 8-p-sulfofenilxantina (SPT) son más solubles en agua pero menos afines y selectivos por el receptor A<sub>1</sub>; el derivado de xantina 8-(noradamantan-3-il)-1, 3-dipropilxantina (KW-3902) es un potente (K<sub>d</sub> ≈ 77 pM) y selectivo antagonista del receptor A<sub>1</sub> (Nonaka et al., 1996).

La caracterización cinética del receptor A<sub>1</sub> de adenosina se ha llevado a cabo mediante estudios de unión de radioligandos agonistas y antagonistas. En membrana aisladas los ligandos agonistas reconocen dos estados de afinidad del receptor A<sub>1</sub>, uno de alta y otro de baja afinidad, mientras que los ligandos antagonistas únicamente reconocen el estado de baja afinidad (Lohse et al., 1984; Mahan et al., 1991; Allende et al., 1991). Este diferente comportamiento es debido a que la unión del agonista al receptor A<sub>1</sub> da lugar a una conformación del receptor distinta de la que se alcanza cuando se une el antagonista (Barrington et al., 1989). De esta manera, únicamente la conformación inducida por el agonista permitiría el estado de alta afinidad, el cual clásicamente se ha asumido que corresponde al ligando unido al complejo receptor-proteína G. El estado de baja afinidad correspondería a complejos ligando-receptor desacoplados de la

proteína G. También se ha sugerido que el antagonista reconoce ambos estados del receptor pero promueve instantáneamente el desacoplamiento del complejo receptor-proteína G (Casadó et al., 1994). Según el modelo de cooperatividad negativa (*cluster-arranged cooperative model*), el cual está basado en la cinética de unión de agonistas al receptor  $A_1$ , el estado de alta y baja afinidad son consecuencia de la cooperatividad negativa de la unión del agonista al receptor y no estaría relacionado con la cantidad de receptores libres o acoplados a la proteína G (Franco et al., 1996). Según este modelo, el ligando agonista a altas concentraciones induciría una transformación del estado de alta al de baja afinidad lo que conduciría a la desensibilización del receptor (Casadó et al., 1991; Franco et al., 1996).

Al igual que ocurre con otros receptores acoplados a proteínas G, la unión de ligandos al receptor está modulada por el  $Mg^{2+}$  y el GTP. Se ha observado que el GTP y sus análogos no hidrolizables como el Gpp(NH)p, producen una disminución de la unión de agonistas al receptor  $A_1$ . Este fenómeno se explicaría por la conversión de estados de alta en baja afinidad inducida por el GTP (Casadó et al., 1990b; Allende et al., 1991; Mahan et al., 1991) o por la pérdida de cooperatividad según el *cluster-arranged cooperative model* (Franco et al., 1996). En la mayoría de casos el GTP únicamente modifica la afinidad ( $K_d$ ) sin cambiar significativamente el número máximo de sitios de unión ( $B_{max}$ ) (Lohse et al., 1984; Casadó et al., 1990b; Allende et al., 1991), aunque en algunos casos los nucleótidos de guanina inhiben parcial o totalmente la unión de agonistas sin cambiar la afinidad (Larrouy et al., 1991). En células de musculatura lisa  $DDT_1MF-2$  el GTP tiene un efecto idéntico a la toxina pertussis (Gerwins et al., 1990). Así, en membranas de estas células se observan dos estados de afinidad en ausencia de GTP, mientras que en presencia de GTP únicamente se observa el estado de baja afinidad. En cambio, en células intactas únicamente se observa el estado de baja afinidad tanto en presencia como en ausencia de GTP, lo que se interpreta como que en la célula la cantidad de GTP endógeno es muy elevada (Gerwins et al., 1990). El ión  $Mg^{2+}$  induce la conversión de estados de baja en estados de alta afinidad por lo que tiene un efecto contrario al GTP. Cuando se combinan el GTP y el  $Mg^{2+}$ , se observa que el catión revierte los efectos de los nucleótidos de guanina (Casadó et al., 1990b). El  $Mg^{2+}$  parece unirse directamente a la proteína G (Ramkumar et al., 1988), aunque también se ha sugerido que puede actuar directamente sobre la unión del ligando al receptor (Reddington et al., 1989). Existe mayor discrepancia en cuanto al efecto del GTP y el  $Mg^{2+}$  en la unión de antagonistas al receptor de adenosina  $A_1$ . Algunos autores indican que el GTP no produce ningún

efecto en la unión del antagonista (Jacobson et al., 1986), otros detectan incrementos de unión de los antagonistas sin afectar o aumentando su afinidad ( Larrouy et al., 1991; Mahan et al., 1991).

La solubilización del receptor  $A_1$  de las membranas con detergentes en ausencia de ligando, pone de manifiesto un único estado de alta afinidad del receptor por los agonistas regulable por los nucleótidos de guanina (Yeung et al., 1987; Casadó et al., 1990b). Determinando el coeficiente de sedimentación se ha comprobado que el receptor se solubiliza unido a la proteína  $G_i$  (Minelli et al., 1997). Este resultado contrasta con la solubilización de otros receptores acoplados a proteína G, en los que para detectar el estado de alta afinidad se requiere que la solubilización se efectúe tras la unión de agonistas a las membranas (Kilpatrick and Caron, 1983). Para descartar que el comportamiento cinético del receptor  $A_1$  solubilizado sea debido a la presencia de adenosina endógena, en algunos casos, se han tratado las membranas con ADA, pero incluso en estos casos se observa el estado de alta afinidad, que es transformado a un estado de baja afinidad en presencia de nucleótidos de guanina (Olah et al., 1990; Casadó et al., 1990b). Casadó y colaboradores han demostrado que la integridad (Casadó et al., 1990b), la fluidez y las características fisico-químicas de la membrana (Casadó et al., 1992) afectan a la unión de ligandos al receptor  $A_1$  y a la distribución de los dos estados de afinidad.

En los últimos años se han descubierto una serie de activadores alostéricos de los receptores de adenosina. Los compuestos 2-amino-3-benzotiofenos son activadores alostéricos específicos del receptor  $A_1$  a bajas concentraciones y antagonistas competitivos de los receptores de adenosina a altas concentraciones (Bruns et al., 1990). Estos compuestos estimulan la unión de varios agonistas del receptor  $A_1$ , pero inhiben la unión del antagonista DPCPX, lo que sugiere que la activación es específica para la conformación del receptor a la que se une el agonista. Uno de los compuestos más potentes es el PD 81723, el cual aumenta la afinidad del receptor por el agonista sin modificar la  $B_{max}$  y parece modificar el acoplamiento entre el receptor  $A_1$  y la proteína G (Bruns et al., 1990; Mudumbi et al., 1993). Por otro lado, la adenoregulina, un péptido de 33 aminoácidos aislado inicialmente de piel de la rana *Phyllomedusa bicolor* (Daly et al., 1992) y posteriormente clonado (Amiche et al., 1993), aumenta la unión de agonistas al receptor  $A_1$  y en menor medida a otros receptores como el  $A_{2A}$ , el  $\alpha_2$  adrenérgico y el  $5HT_{1A}$ . La adenoregulina incrementa el valor de la  $B_{max}$ , la proporción de receptores en estado de alta afinidad y estimula la unión de [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S (Moni et al., 1995).



### 2. 4. 3. Transducción de señal a través del receptor A<sub>1</sub>

Un gran número de neurotransmisores, hormonas peptídicas, neuromoduladores y factores autocrinos y paracrinos inducen cambios en el metabolismo celular a través de la interacción con receptores específicos de siete dominios transmembrana. Los efectos intracelulares de estos receptores están mediados por la activación de las proteínas G heterotriméricas, las cuales activan o inhiben una serie de enzimas y canales iónicos. Estos sistemas efectores regulan la concentración de una serie de segundos mensajeros tales como el AMP<sub>c</sub>, IP<sub>3</sub>, diacilglicerol y Ca<sub>i</sub><sup>2+</sup>, los cuales en última instancia, conducen a la respuesta celular.

Las proteínas G mediadoras de la señal entre el receptor de membrana y los sistemas efectores intracelulares, son miembros de una gran superfamilia de proteínas que unen GTP y poseen actividad GTPasa intrínseca (Neer, 1995). Las proteínas heterotriméricas G están formadas por tres subunidades,  $\alpha$  (39-45 kDa),  $\beta$  (37 kDa) y  $\gamma$  (8kDa). En mamíferos existen unas 20 subunidades  $\alpha$  diferentes codificadas al menos por 16 genes (Kazirot et al., 1991). Estas proteínas se han clasificado en cuatro subfamilias:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$  y  $\alpha_{12/13}$ , en función de la similitud de la estructura primaria (Tabla 2). La mayoría de subunidades  $\alpha$  están ampliamente distribuidas en los tejidos, con la excepción de las halladas en los órganos sensoriales ( $\alpha_t$ ,  $\alpha_{gust}$  y  $\alpha_{olf}$ ), en las células hematopoyéticas ( $\alpha_{16}$ ) o en células neuronales ( $\alpha_o$ ). La subunidad  $\alpha$  está formada por un dominio GTPasa, un dominio  $\alpha$ -helicoidal y la región variable amino terminal (Lambright et al., 1996). El dominio variable amino terminal de la subunidad  $\alpha$  es esencial para su interacción con las subunidades  $\beta\gamma$  (Denker et al., 1992), mientras que el dominio carboxi terminal parece definir la especificidad de la interacción proteína G-receptor, si bien no es el único dominio determinante de la especificidad (Conklin et al., 1993).

Se conocen cinco subunidades diferentes  $\beta$  que presentan una identidad del 53-90 % (Watson et al., 1994). La subunidad  $\beta$  está formada por una región amino terminal seguida de siete unidades repetitivas de hoja  $\beta$  (Sondek et al., 1996). La región amino terminal de la subunidad  $\beta$  está formada por una hélice  $\alpha$  anfipática, la cual forma una estructura cola-cola (*coiled-coil*) con la parte amino terminal de la subunidad  $\gamma$ . La subunidad  $\gamma$ , menos conservada que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Cali et al., 1992), está formada por dos hélices  $\alpha$  con una región media que interacciona y determina la selectividad por las diferentes subunidades  $\beta$  (Lupas et al., 1992; Spring and Neer, 1994; Lambright et al., 1996). La subunidad  $\beta\gamma$  forma una estructura globular cuyas subunidades interaccionan fuertemente y sólo pueden separarse por agentes

desnaturalizantes. Aunque podrían producirse numerosas combinaciones de subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  no todas son posibles. Por ejemplo la subunidad  $\beta_1$  interacciona con la  $\gamma_1$  y  $\gamma_2$ , mientras que la  $\beta_2$  interacciona con la  $\gamma_2$  pero no con la  $\gamma_1$  (Schmidt et al., 1992).

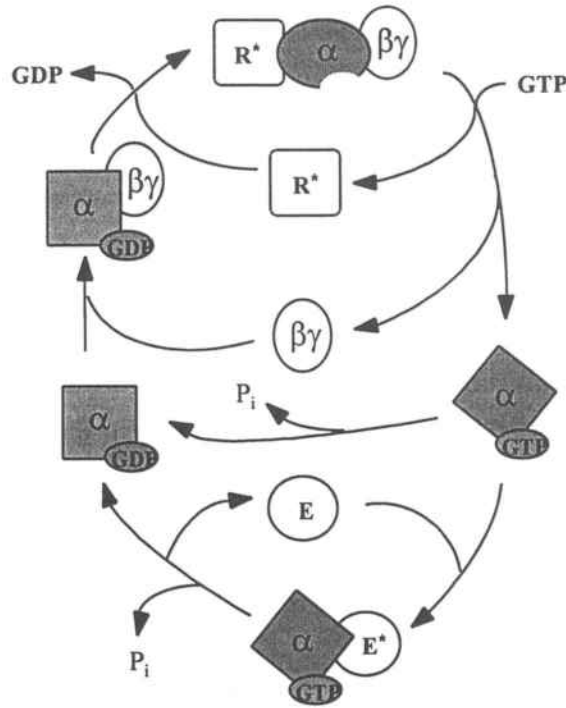
Familia	Subfamilia	Efectores	Mensajero Intracelular
$G\alpha_s$	$\alpha_s$	↑ Adenilato ciclasa ↑ Canales $Ca^{2+}$	↑ $AMP_c$ ↑ $Ca^{2+}$
	$\alpha_{olf}$	↑ Adenilato ciclasa	↑ $AMP_c$
$G\alpha_i$	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	↓ Adenilato ciclasa ↑ Canales $K^+$	↓ $AMP_c$ ↑ $K^+$
	$\alpha_0$	↓ Canales $Ca^{2+}$	↓ $Ca^{2+}$
	$\alpha_2$	↓ Adenilato ciclasa	↓ $AMP_c$
	$\alpha_{t1}$	↑ $GMP_c$ fosfodiesterasa	↓ $GMP_c$
	$\alpha_{t2}$	↑ $GMP_c$ fosfodiesterasa	↓ $GMP_c$
	$\alpha_{gust}$	??	
	$G\alpha_q$	$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}$	↑ Fosfolipasa C ( $\beta$ )
$G_{12/13}$	$\alpha_{12}, \alpha_{13}$	↑↓ Intercambio $Na^+/K^+$	
$G_{\beta\gamma}$	$\beta\gamma$	↓ Adenilato ciclasa (I) ↑ Adenilato ciclasa (II, IV) ↑ Canales $K^+$ ↑ Fosfolipasa $A_2$ ↑ Fosfolipasa C $\beta$ ARK	↓ $AMP_c$ ↑ $AMP_c$ ↑ $K^+$ ↑ Ac.Araquid. ↑ $IP_3, \uparrow DAG$

**Tabla 2. Clasificación y función de las subunidades de las proteínas G.**

(Conklin and Bourne, 1993; Neer, 1995).

La subunidad  $\beta\gamma$  tiene numerosas funciones: (1) estabiliza la forma GDP- $\alpha$  y facilita su asociación con los receptores de membrana para formar el complejo ternario receptor- $\alpha\beta\gamma$  (Clapham and Neer, 1993), (2) facilita la formación del complejo receptor-proteína quinasa que posibilita la fosforilación del receptor (Lefkowitz, 1993; Pitcher et al., 1992), y (3) activa directamente numerosos sistemas efectores (Clapham and Neer, 1993).

El mecanismo de señalización común a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Figura 8; Birnbaumer, 1990; Bourne et al., 1991; Conklin and Bourne, 1993; Neer, 1995) se inicia con la unión del agonista a su receptor específico en la superficie celular. Esta interacción provoca un cambio conformacional en el receptor y permite su interacción con el heterotrímero inactivo GDP- $\alpha$ - $\beta\gamma$ . Si bien la subunidad monomérica  $\alpha$ -GDP puede interaccionar con el receptor, esta asociación es potenciada por la subunidad  $\beta\gamma$ , presumiblemente porque el receptor activo se une directamente a  $\beta\gamma$  y estabiliza el complejo receptor- $\alpha$ - $\beta\gamma$  (Phillips et al., 1992). La interacción del complejo GDP- $\alpha$ - $\beta\gamma$  con el receptor provoca un cambio conformacional en la subunidad  $\alpha$  de manera que pierde afinidad por el GDP y éste se libera del centro activo. Debido a que la concentración de GTP en la célula es mucho mayor que la de GDP, el grupo saliente GDP es reemplazado por GTP. En el momento que el GTP se une a la subunidad  $\alpha$ , el complejo  $\alpha$ -GTP cambia de conformación, lo que provoca la disociación del receptor y de la subunidad  $\beta\gamma$ . El complejo  $\alpha$ -GTP tiene una alta afinidad para unirse y activar efectores específicos, permaneciendo en estado activado hasta que la actividad GTPasa de la propia subunidad  $\alpha$  hidroliza el GTP a GDP, en cuyo momento la proteína  $G_\alpha$  vuelve a su estado inactivo GDP- $\alpha$  y se reasocia con la subunidad  $\beta\gamma$ . Todas las subunidades  $\alpha$  son GTPasas aunque la actividad de hidrólisis intrínseca varía de un tipo a otro (Linder et al., 1990). La velocidad de la hidrólisis del GTP es un mecanismo limitante que controla el tiempo de duración de la activación de los efectores por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . La reasociación interrumpe la activación de los sistemas efectores y permite un nuevo ciclo de señalización. Es importante destacar que muchos efectores son regulados tanto por la subunidad  $\alpha$  como por la  $\beta\gamma$ . En la tabla 2 se muestran los sistemas efectores acoplados a las diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . Las subunidades  $\beta\gamma$  regulan positivamente la adenilato ciclasa, los canales de  $K^+$ , la fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ), la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la fosfoinositol 3-quinasa y la  $\beta$ AR quinasa (Clapham and Neer, 1993). Además la subunidad  $\beta\gamma$  puede actuar a través de *ras* para activar la vía de las MAP quinasas (Crespo et al., 1994).



**Figura 8. Ciclo GTPasa de la proteína G $\alpha$  y su asociación con el complejo receptor-ligando (R), las subunidades  $\beta\gamma$  y el efector (E).**

Algunas subunidades  $\alpha$  se modifican covalentemente por reacciones de ADP ribosilación catalizadas por toxinas bacterianas. La toxina pertussis, aislada de *Bordetella Pertussis*, ADP ribosila un residuo de cisteína próximo al extremo C-terminal de las subunidades  $\alpha_i$  y  $\alpha_o$  de la proteína G. La modificación de la toxina pertussis impide la activación de la proteína G mediada por el receptor, por lo que desacopla irreversiblemente el receptor del sistema efector (Hepler and Gilman, 1992). Por el contrario, la toxina del colera, aislada de *Vibrio Cholerae*, cataliza la ADP ribosilación de un residuo de arginina del centro activo de la subunidad  $\alpha_s$ . Esta modificación activa constitutivamente la proteína G por inhibición de la actividad GTPasa (Yamane and Fung, 1993). Análogos no hidrolizables de GTP, como el Gpp(NH)p, también mantienen indefinidamente la proteína G en estado activado.

Una célula sólo puede responder a aquellas señales para las cuales tiene receptor, pero la especificidad con la que el receptor interacciona con la proteína G define la respuesta celular. Hay muchos más tipos de receptores que de proteínas G y además un sólo tipo de receptor puede activar más de una proteína G iniciando más de un mecanismo de transducción de señal (Gudermann et al., 1992; Allgeier et al., 1994). Aunque un sólo receptor puede activar

potencialmente múltiples señales, el número de señales producidas es relativamente bajo (Neer, 1995). La selectividad puede residir en que se produzca o no, en un determinado dominio de la membrana plasmática de la célula, el acoplamiento receptor/proteína G y el acoplamiento proteína G/efector. Existen evidencias que la distribución y movilidad de las proteínas G y los receptores en las células pueden estar restringidas a ciertos microdominios de membrana, tales como caveolas, lo que contribuiría también a la selectividad de la señalización a través de las proteínas G (Neubig, 1994). Además, el hecho de que existan combinaciones específicas de subunidades  $\beta\gamma$  es también crítico para la selectividad. La naturaleza lipídica del extremo amino terminal de la subunidad  $\alpha$  (palmitoil y miristoil) y del grupo prenil del extremo carboxi terminal de la subunidad  $\gamma$  determinan la unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  a la membrana plasmática, la asociación de la subunidad  $\beta\gamma$  con la  $\alpha$  y la activación por el receptor o del sistema efector (Casey, 1994).

El receptor  $A_1$  de adenosina está acoplado a diversos sistemas efectores a través de los cuales modifica la concentración de segundos mensajeros. La mayoría de los efectos de la adenosina a través del receptor  $A_1$  son bloqueados por la toxina pertussis (Munshi and Linden, 1990; Iredale et al., 1994), lo que demuestra que este receptor interacciona directamente con la proteína  $G_i$  y/o  $G_0$ . La activación de estas proteínas G inician la transducción de la señal del receptor  $A_1$ .

La activación de las proteínas  $G_i$  y  $G_0$  con agonistas del receptor  $A_1$  se ha estudiado a través de la unión de [ $^{35}$ S]GTP[S] a la subunidad  $\alpha$  en membranas de cerebro bovino (Lorenzen et al., 1993b; Lorenzen et al., 1996b). La estimulación de la unión del [ $^{35}$ S]GTP[S] a la proteína G correlaciona con la afinidad de los ligandos agonistas del receptor  $A_1$ , depende de la temperatura, de la presencia de  $Mg^{2+}$  y es inhibida por antagonistas. Se han obtenido evidencias más directas de interacción del receptor  $A_1$  con las proteínas G, mediante experimentos de purificación de ambas proteínas y reconstitución en vesículas. La purificación del receptor  $A_1$  de cerebro bovino mediante cromatografía de afinidad con agonistas muestra que éste copurifica junto con las proteínas  $G_{\alpha i1}$ ,  $G_{\alpha i2}$  y  $G_{\alpha 0}$  (Munshi and Linden, 1989). El receptor  $A_1$  purificado interacciona con las proteínas  $G_{\alpha i1-2}$  y  $G_0$  recombinantes o purificadas, induciendo el estado de alta afinidad por el agonista en vesículas fosfolipídicas reconstituidas (Freissmuth et al., 1991; Munshi et al., 1991). El estado de alta afinidad del receptor  $A_1$  bovino expresado en células de insecto Sf9 se incrementa siete veces cuando se reconstituye el sistema con las subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$ ,  $\alpha_{i3}$  y  $\alpha_0$ ) y  $\beta\gamma$  ( $\beta_1\gamma_1$ ,  $\beta_1\gamma_2$ ,  $\beta_1\gamma_3$ ,  $\beta_2\gamma_2$  y  $\beta_2\gamma_3$ ). El receptor  $A_1$  bovino se acopla igualmente

bien a las subunidades  $\alpha_1$  y  $\alpha_0$  cuando se combinan con las subunidades  $\beta_1$  o  $\beta_2$  y  $\gamma_2$  o  $\gamma_3$ , pero la interacción disminuye con el dímero  $\beta_1\gamma_1$  (Figler et al., 1996). Los receptores  $A_1$  recombinantes de cerebro humano y bovino en presencia de la subunidad  $\beta\gamma$ , interaccionan igualmente bien con las subunidades  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$ ,  $\alpha_{i3}$  y  $\alpha_0$ , mientras que la  $\alpha_s$  es inactiva (Jockers et al., 1994). Sin embargo, las características farmacológicas y la especificidad de la interacción del receptor con las proteínas G dependen de la especie. Así mientras que la subunidad  $G_{\alpha i3}$  es más potente que el resto en reconstituir el estado de alta afinidad para el agonista R-PIA en membranas bovinas, en membranas de cerebro humano todas las proteínas G citadas son equipotentes (Jockers et al., 1994). En músculo cardíaco se ha observado que el receptor  $A_1$  media sus acciones principalmente a través de la proteína  $G_0$  (Asano et al., 1995). En cambio, en musculatura lisa intestinal de conejo el receptor  $A_1$  activa al sistema efector fosfolipasa C- $\beta_3$  tanto vía la proteína  $G_{\alpha i3}$  como la  $\beta\gamma$  (Murthy and Makhlof, 1995).

A través de las proteínas  $G_{i/0}$  el receptor  $A_1$  de adenosina activa o inhibe la formación de distintos segundos mensajeros. El receptor  $A_1$  disminuye los niveles de  $AMP_c$  al inhibir la adenilato ciclasa (Londos et al., 1980; Freund et al., 1994); activa canales de  $K^+$  (Trussell and Jackson, 1985); inhibe canales de  $Ca^{2+}$  (Dolphin et al., 1986; Mogul et al., 1993; Mei et al., 1996); e inhibe o activa la fosfolipasa C (Gerwins and Fredholm, 1992; Freund et al., 1994; Murthy and Makhlof, 1995). El receptor  $A_1$  también puede estar acoplado a la enzima guanilato ciclasa estimulando la formación de  $GMP_c$  (Kurtz, 1987). Este sistema parece ser el encargado de mediar la acción de análogos de la adenosina sobre la liberación de renina en el riñón (Kurtz et al., 1988). En células derivadas de musculatura lisa de hamster DDT<sub>1</sub>MF-2 la activación del receptor  $A_1$  con agonistas disminuye la concentración de  $AMP_c$  a través de la inhibición de la adenilato ciclasa (Gerwins et al., 1990), activa la fosfolipasa C lo que provoca la hidrólisis de fosfatidilinositoldifosfato ( $PIP_2$ ) en inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ), el cual conduce a movilizar  $Ca^{2+}$  de reservorios intracelulares (Gerwins and Fredholm, 1992; Dickenson and Hill, 1993), y en diacilglicerol que activa a la PKC. Además, en estas células la adenosina y el ATP actúan sinérgicamente en la formación de  $IP_3$  y en la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular (Gerwins and Fredholm, 1992). Ninguno de estos segundos mensajeros se produce cuando las células se pretratan con la toxina pertussis, lo que indica que en estas células el receptor  $A_1$  se acopla a la proteína  $G_i$ .

#### 2. 4. 4. Distribución tisular del receptor A<sub>1</sub>

La distribución y abundancia relativa del receptor A<sub>1</sub> de adenosina en los diferentes tejidos se analizó inicialmente mediante técnicas de unión de agonistas y antagonistas radiomarcados (Bruns et al., 1987) y técnicas de fotomarcaje y autorradiografía (Klotz et al., 1985). Tras la clonación del receptor se obtuvieron anticuerpos específicos contra el receptor y sondas de su RNA, lo que ha permitido cuantificar directamente la cantidad relativa del receptor mediante técnicas inmunocitoquímicas y de Northern blot (Ciruela et al., 1995; Stehle et al., 1992; Dixon et al., 1996). El receptor A<sub>1</sub> está ampliamente distribuido en el organismo. En humanos se expresa en gran cantidad en cerebro y testículo y con menor pero significativa abundancia en corazón, páncreas, riñón y bazo (Rivkees et al., 1995a). En cerdo también se expresa mayoritariamente en cerebro, mientras que los testículos, el epidídimo, el corazón y el riñón expresan cantidades menores (Casadó et al., 1990a; Ciruela et al., 1995). En rata, mediante análisis por Northern blot se observa una gran cantidad de mRNA del receptor A<sub>1</sub> en cerebro, médula espinal, bazo y vasos deferentes, moderados niveles en corazón, testículo e hígado y niveles no detectables en riñón, intestino, pulmón, pituitaria, próstata y útero (Mahan et al., 1991; Stehle et al., 1992). En esta última especie, mediante técnicas de amplificación por PCR, se ha detectado una gran expresión en casi todas las áreas del cerebro, expresión moderada en corazón, testículo, hígado, aorta, bazo, riñón, ojo y vejiga urinaria, menor expresión en pulmón, útero y estómago y niveles no detectables en piel, músculo esquelético, colon y yeyuno (Dixon et al., 1996). En testículos de rata, mediante análisis por Northern blot e hibridación *in situ* se detectan grandes cantidades de receptor A<sub>3</sub>, moderadas de A<sub>1</sub> y no se detecta A<sub>2A</sub> ni A<sub>2B</sub> (Rivkees, 1995). Estos resultados son concordantes con la cuantificación del receptor mediante unión de radioligandos a diferentes tejidos de rata (Bruns et al., 1986). La distribución del receptor A<sub>1</sub> en cobaya es similar al resto de especies, siendo el cerebro el órgano de mayor expresión seguido de corazón, bazo y riñón. En esta especie no se detecta en pulmón, hígado, estómago e intestino (Meng et al., 1994). En intestino de rata (Nicholls et al., 1992) y cobaya (Murthy et al., 1995) la presencia simultánea de receptores A<sub>1</sub> y A<sub>2B</sub> estaría relacionada con funciones diferentes para cada subtipo de receptor (Hancock and Coupar, 1995).

De lo expuesto anteriormente, se puede deducir que en el sistema nervioso central es donde se observa mayor expresión de receptor A<sub>1</sub> en todas las especies estudiadas. La unión de radioligandos (Bruns et al., 1986) y ensayos de Northern blot e hibridación *in situ* (Mahan et al.,

1991; Stehle et al., 1992; Meng et al., 1994; Dixon et al., 1996) permiten afirmar que las zonas con mayor cantidad de receptor  $A_1$  en el cerebro de las diferentes especies son la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el tálamo y el estriado. La expresión de este receptor parece más evidente en neuronas que en células gliales (Mahan et al., 1991). En neuronas se ha localizado tanto a nivel pre- como post-sináptico (Abbracchio et al., 1995). La expresión del receptor  $A_1$  en cerebro de rata está regulada en las diferentes fases del desarrollo, aumentando a medida que se suceden los días de gestación hasta conseguirse la extensa y heterogénea distribución característica del adulto (Weaver, 1996).

En el aparato urogenital de rata y ratón se han localizado receptores  $A_1$  y  $A_{2B}$  tanto en uniones pre- como postneuromusculares de la vejiga urinaria (Nicholls et al., 1992). En uniones neuromusculares en vaso deferente se han localizado receptores inhibidores  $A_1$  y estimuladores  $A_{2A}$  de la liberación de neurotransmisores, tales como acetilcolina y ATP (Martin and May, 1994; Gonçalves and Queroz, 1993; Hourani et al., 1993; Driessen et al., 1994). Todos estos receptores estarían implicados en el desarrollo y modulación de las contracciones en los vasos deferentes.

#### **2. 4. 5. Efectos fisiológicos de la adenosina a través del receptor $A_1$**

La adenosina participa en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y patológicos en los diferentes tejidos del organismo a través de la activación de sus receptores específicos de membrana (Tabla 3). En la mayoría de órganos la función de la adenosina está relacionada con la regulación del aporte y consumo local de oxígeno. La producción de adenosina aumenta cuando la demanda energética es mayor que el aporte energético, como por ejemplo en estados de hipoxia. En estas condiciones, la adenosina extracelular, procedente principalmente del metabolismo intracelular del ATP, actúa disminuyendo la demanda de oxígeno y aumentando el suministro de éste (Miller and Hsu, 1992). La disminución de la actividad locomotora, la inhibición de la neurotransmisión y la disminución del ritmo cardíaco son efectos que la adenosina ejerce a través de los receptores  $A_1$  y que tienden a reducir la demanda de oxígeno (Belardinelli, 1993; Zhu and Krnjevic, 1997). Por otra parte, la vasodilatación en el cerebro, corazón y otros tejidos (excepto riñón) que produce la adenosina a través de los receptores  $A_2$ , junto con los efectos de los receptores  $A_1$ , tienden a incrementar el flujo sanguíneo y a mejorar el suministro de oxígeno (Fredholm and Sollevi, 1986).



TEJIDO	EFEECTO FISIOLÓGICO	RECEPTOR
Sistema nervioso central	Inhibición liberación neurotransmisores	A <sub>1</sub>
	Inhibición actividad locomotora	A <sub>2A</sub>
	Sedación	A <sub>1</sub>
	Anticonvulsivo	A <sub>1</sub>
Sistema cardiovascular	Vasoconstricción	A <sub>1</sub>
	Vasodilatación	A <sub>2A</sub>
	Inhibición ritmo cardíaco	A <sub>1</sub> , A <sub>3</sub>
	Inhibición agregación plaquetaria	
Aparato respiratorio	Broncodilatación	A <sub>2A</sub>
	Broncoconstricción	A <sub>1</sub>
	Modulación secreción mucosa	??
Riñón	Antidiurético	A <sub>1</sub>
	Descenso flujo filtración glomerular	A <sub>1</sub>
	Modulación liberación renina	A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>
	Contracción células mesangiales	A <sub>1</sub> /A <sub>3</sub>
Sistema inmune	Inhibición quimiotaxis (neutrófilos)	A <sub>1</sub>
	Inhibición producción superóxidos	A <sub>2A</sub>
	Función linfocitos T	A <sub>2B</sub>
Hígado	Estimulación captación glucosa	??
	Estimulación glucogenolisis	A <sub>2A</sub>
Tejido adiposo	Inhibición lipolisis	A <sub>1</sub>
Aparato reproductor	Testículos	A <sub>1</sub> /A <sub>3</sub>
	Vaso deferente	A <sub>1</sub> /A <sub>2A</sub>
	(contracción musculatura lisa)	

**Tabla 3. Efectos fisiológicos de la adenosina mediados por sus receptores de membrana.**  
(Referencias en el texto).

La adenosina actúa como neuromodulador al inhibir la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico (Fredholm and Dunwiddie, 1988). La liberación de neurotransmisores excitadores parece estar más fuertemente inhibida por la adenosina que la de los neurotransmisores inhibidores, por lo que es un proceso encaminado a reducir la actividad neuronal y el consumo de oxígeno (Fredholm and Dunwiddie, 1988). En el sistema nervioso central, el receptor  $A_1$  está ampliamente distribuido en numerosas regiones del cerebro (Dixon et al., 1996) y se localiza presinápticamente en terminales nerviosas (Dagani et al., 1993; Abbracchio et al., 1995). La adenosina, formada a partir del ATP liberado durante la sinápsis, activa los receptores  $A_1$  situados a nivel presináptico inhibiendo la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina (Cunha et al., 1994; Broad and Fredholm, 1996), la dopamina (Jin et al., 1993; Ballarin et al., 1995), la noradrenalina, la serotonina, el aspartato y el glutamato (Abbracchio et al., 1995). Estos efectos parecen estar mediados por la apertura de canales de  $K^+$  y el cierre de canales de  $Ca^{2+}$  (Fredholm and Dunwiddie, 1988; Fredholm, 1995).

Este efecto de la adenosina tiene gran importancia durante la isquemia cerebral, caracterizada por una disminución del flujo sanguíneo cerebral, reducción energética, acidosis tisular y modificación de la homeostasis. El efecto neuroprotector de la adenosina a través del receptor  $A_1$  durante la isquemia cerebral consistiría en la disminución de la liberación de aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato), los cuales son en parte responsables del estado patológico (Miller and Hsu, 1992; Rudolphi et al., 1992).

En el riñón, la adenosina actúa reduciendo la velocidad de filtración glomerular mediante la vasoconstricción de las arteriolas aferentes a través del receptor  $A_1$  y la vasodilatación de las eferentes a través del receptor  $A_2$  (Biaggioni, 1992). En este mismo órgano la adenosina inhibe ( $A_1$ ) y estimula ( $A_2$ ) la liberación de renina y la producción de eritropoyetina (Spielman and Arend, 1991; Protasoni et al., 1996).

La adenosina aplicada por vía intravenosa modifica la velocidad y el ritmo respiratorio, lo que sugiere que está implicada en la regulación de la respiración (Bissonnette et al., 1991). En personas sanas, la adenosina induce broncodilatación a través de los receptores  $A_2$ , mientras que en pacientes asmáticos, contrariamente, induce broncoconstricción (Jacobson, 1990). Este último efecto se bloquea débilmente por las xantinas (Ali et al., 1992) y posiblemente está mediado por la liberación de histamina y leucotrienos (Linden, 1994). Se ha sugerido que el receptor  $A_3$ , expresado abundantemente en pulmón, podría estar implicado en el efecto broncoconstrictor de la adenosina (Linden, 1994), si bien estudios recientes con conejos asmáticos han descartado la

implicación de este receptor (Elhashim et al., 1996). La terapia *antisense* contra la expresión del receptor  $A_1$  en conejos asmáticos atenúa el efecto broncoconstrictor de la adenosina lo que verifica que el receptor implicado en este proceso es el  $A_1$  (Nyce and Metzger, 1997).

#### **2. 4. 6. Regulación del receptor $A_1$ en la membrana celular**

La respuesta celular inducida por exposición a los agonistas de los receptores acoplados a proteína G es rápidamente atenuada (Lohse, 1993, revisión). Los mecanismos de atenuación de la señal comprenden por un lado, la desaparición del agonista del medio extracelular por acción de transportadores específicos o de enzimas degradativas de la membrana y por otro, la regulación del receptor mediante el proceso de desensibilización. La desensibilización es el fenómeno mediante el cual la estimulación crónica de la célula por un agonista provoca una disminución de la respuesta celular a posteriores estímulos. Los mecanismos implicados en la atenuación de la respuesta celular son de gran importancia ya que impiden la sobreestimulación y la lesión de la célula. Se distinguen dos tipos de desensibilización: la homóloga y la heteróloga. La desensibilización homóloga es debida a la pérdida de funcionalidad del receptor directamente estimulado por su agonista. La desensibilización heteróloga, por el contrario, se caracteriza por la pérdida de sensibilidad provocada por la activación de otros receptores.

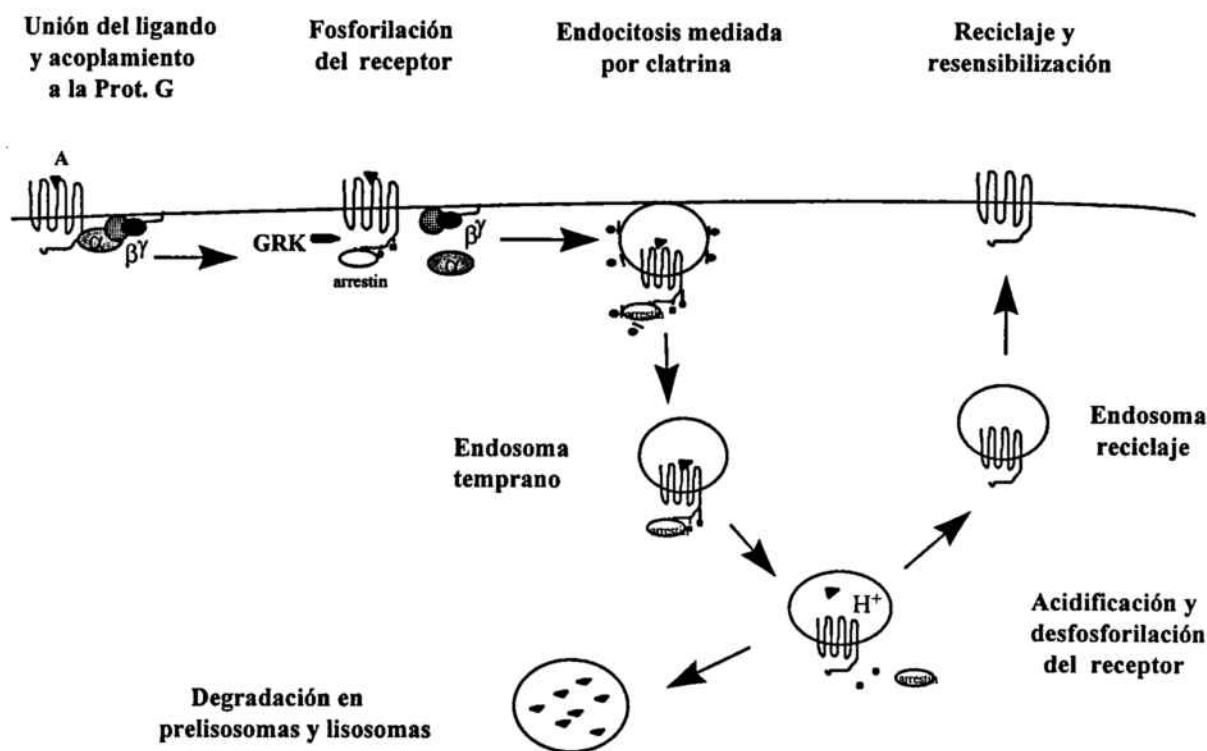
##### **2. 4. 6. 1. Características generales de la desensibilización homóloga**

La desensibilización homóloga es aquella mediante la cual la exposición a un agonista, disminuye la funcionalidad del receptor estimulado. En este tipo de desensibilización están implicados varios procesos separados en el tiempo. A tiempos cortos (de segundos a minutos), la exposición de las células a los agonistas provoca el desacoplamiento del receptor y la proteína G, de manera que finaliza la señalización. Este fenómeno inicial puede ir acompañado de la internalización o secuestro del receptor hacia compartimentos intracelulares. La exposición continuada (de horas a días) al agonista puede provocar *down-regulation* o pérdida de receptores de la célula y/o de componentes del sistema de transducción de la señal (Böhm et al., 1997).

Entre los más de 100 receptores acoplados a proteínas G que han sido clonados, el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico ( $\beta_2AR$ ) ha sido el prototipo para el estudio de la regulación de la expresión en la membrana de los receptores de esta superfamilia (Collins et al., 1991; Lohse,

1993). Los receptores adrenérgicos median las acciones metabólicas y neuroendocrinas de las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina. La estimulación prolongada del  $\beta_2$ AR con agonistas provoca un rápido desacoplamiento del sistema efector, secuestro a compartimentos intracelulares y *down-regulation* del receptor (Figura 9).

Durante las primeras fases del proceso de desensibilización, el receptor  $\beta_2$ AR es fosforilado por proteínas quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (Roth et al., 1991), lo que provoca su desacoplamiento funcional de la proteína G (Sibley et al., 1986; Lohse et al., 1989). Los receptores  $\beta_2$ AR también son fosforilados por proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros, como la PKA, aunque en este caso la fosforilación parece estar también



**Figura 9. Modelo de desensibilización y resensibilización** propuesto para el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y el  $NK_1$  de neuroquinina (Böhm et al., 1997).

asociada a la desensibilización heteróloga de receptores acoplados al mismo sistema efector (apartado 2.4.6.2). Las quinasas que forman la familia de las GRK son: la rodopsina quinasa (GRK1), la  $\beta$ ARK1 (GRK2), la  $\beta$ ARK2 (GRK3), la GRK4, la GRK5 y la GRK6 (Lefkowitz, 1993; Premont et al., 1995). Las GRKs son Ser/Thr quinasas que fosforilan receptores acoplados a proteínas G cuando estos se encuentran en su conformación activa, es decir, unido a agonista (Palczewski and Benovic, 1991). Estas quinasas presentan entre ellas una similitud de secuencia del 53-93 %. Las GRKs están formadas por un dominio central con actividad quinasa franqueado por el extremo amino terminal de 183-188 aminoácidos y el extremo carboxi terminal de longitud variable (Inglese et al., 1993). El extremo amino terminal es el encargado de reconocer y unirse al receptor, mientras que el carboxi terminal, además de contener sitios de autofosforilación, es el encargado de unir la GRK a la membrana (Koch et al., 1993; Inglese et al., 1993). En general, no existe una especificidad absoluta de una GRK por un receptor concreto. Así por ejemplo, la GRK1 puede fosforilar al receptor de rodopsina y al  $\beta_2$ AR. La GRK2 no sólo fosforila al  $\beta_2$ AR, sino que es capaz de fosforilar a los receptores muscarínicos m1, m2 y m3, a los adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2B}$  y  $\beta_1$ , al receptor de adenosina  $A_1$ , al receptor  $D_1$  de dopamina, al receptor NK1 de neuroquinina y al receptor de trombina (Böhm et al., 1997).

La desensibilización inducida por el agonista de los receptores adrenérgicos mediada por la PKA es bastante más lenta que la mediada por  $\beta$ ARK1 ( $t_{1/2}$  2 min vs. 15seg), pero es mucho más sensible a la concentración de agonista ( $EC_{50} \approx 10$  nM vs. 300 nM) (Lohse et al., 1989, 1990a; Roth et al., 1991). Este hecho hace suponer que la desensibilización mediada por la PKA puede ser un proceso ubicuo sensible a bajas concentraciones de agonista, mientras que la desensibilización mediada por  $\beta$ ARK1 podría tener lugar durante procesos como la sinapsis, donde son liberadas altas concentraciones ( $\mu$ M) de neurotransmisores. La fosforilación catalizada por quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA y/o PKC) y/o GRKs participa en el proceso de desensibilización de diversos receptores distintos de los adrenérgicos, tales como el  $\delta$  de opiáceos (Pei et al., 1995), el receptor del péptido liberador de gastrina GRP-R (Benya et al., 1995), el de colecistoquinina (Rao et al., 1997a, b), el  $AT_{1A}$  de angiotensina (Oppermann et al., 1996), el 5-HT $_{1A}$  (Raymond, 1991; Raymond and Olsen, 1994) y el 5-HT $_{2C}$  de serotonina (Westphal et al., 1995) y el  $D_1$  de dopamina (Ng et al., 1994).

Después de ser fosforilado, el receptor  $\beta_2$ AR se une a la  $\beta$ -arrestina. Las  $\beta$ -arrestinas pertenecen a una familia de proteínas que incluye: la arrestina o *retinal arrestin* (Palczewski et al., 1992), la  $\beta$ -arrestina (Lohse et al., 1990b), la arrestina3 (Attramadal et al., 1992) y la

arrestina4 (Murakami et al., 1993), con un alto grado de homología entre ellas. Las arrestinas reconocen la forma fosforilada del receptor y tras su unión, desacoplan el receptor de la proteína G heterotrimérica (Lohse et al., 1990b). Así, la sobreexpresión de  $\beta$ -arrestina en células CHO transfectadas con el  $\beta_2$ AR provoca un aumento del 40% en la desensibilización del receptor inducida por agonista (Pippig et al., 1993). Algunas arrestinas muestran cierta selectividad por algunos receptores. Así, la arrestina es 100 veces más potente que la  $\beta$ -arrestina en desacoplar la interacción  $G_i$ -rodopsina. La  $\beta$ -arrestina y la arrestina3 son 100 veces más potentes que la arrestina en desacoplar la interacción  $\beta_2$ AR- $G_s$  (Attramadal et al., 1992). La diversidad de arrestinas y GRKs que interaccionan con diversos receptores, parece indicar que el mecanismo propuesto para el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico puede constituir un mecanismo de desensibilización homóloga, más o menos general, para otros receptores acoplados a proteínas G.

Tras la desensibilización funcional del receptor, que se alcanza cuando se desacopla de la proteína G, éste se internaliza o secuestra desde la membrana plasmática a compartimentos intracelulares. La vía clásica de internalización selectiva de receptores de nutrientes (LDL y transferrina), factores de crecimiento (EGF), insulina y ciertos antígenos, tiene lugar en regiones especializadas de la membrana denominadas hendiduras cubiertas o *coated pits* (Smythe and Warren, 1991, revisión). Estas regiones están revestidas por la proteína clatrina, la cual interacciona con la cola citoplasmática del receptor a través de su interacción con una proteína "adaptadora" (Pearse et al., 1988). Tras la unión del ligando a su receptor específico, los complejos receptor/ligando se agregan en las hendiduras cubiertas, de manera que la agregación de varios complejos provoca la invaginación de la hendidura, su escisión de la membrana y la liberación de la vesícula cubierta (*coated vesicle*) al citosol celular. La clatrina se desacopla y el contenido de la vesícula cubierta se libera al endosoma temprano. Los receptores internalizados junto con los ligandos pueden ser transportados a gránulos de almacenamiento o degradados en los lisosomas, mientras que sólo los receptores pueden ser reciclados a la membrana celular.

Entre los receptores acoplados a proteínas G, el  $\beta_2$ AR también es el sistema en que más se ha estudiado el mecanismo de internalización. En respuesta al agonista, el  $\beta_2$ AR, tras su fosforilación y la desensibilización funcional mediada por la  $\beta$ -arrestina, es rápidamente (min) translocado al interior celular vía vesículas que contienen receptores de transferrina, típicos marcadores de vesículas de clatrina (von Zastrow and Kobilka, 1992; Barak et al., 1997). En este sistema, se ha observado que la  $\beta$ -arrestina y la arrestina3, no sólo actúa desacoplando el receptor del sistema efector, sino que actúan como moléculas adaptadoras de clatrina (Ferguson

et al., 1996). La  $\beta$ -arrestina actúa como una molécula “adaptadora” entre el receptor y la clatrina, de manera que promueve la internalización del  $\beta_2$ AR, a través de la vía endocítica (Ferguson et al., 1996; Goodman et al., 1996). Estudios recientes han demostrado la unión directa de la  $\beta$ -arrestina y la arrestina3, pero no la arrestina, a la clatrina (Goodman et al., 1996). Se ha demostrado que el extremo carboxi terminal de la arrestina3 y los residuos 86-100 de la cadena pesada de la clatrina son los dominios responsables de la interacción de estas dos proteínas (Goodman et al., 1997; Krupnick et al., 1997).

Es un hecho controvertido si la fosforilación del receptor es suficiente para inducir su internalización. Para algunos receptores este hecho parece ser cierto. Así, la mutación de residuos de Ser/Thr de sitios consenso de fosforilación para PKC del extremo carboxi terminal del receptor del péptido liberador de gastrina, atenúa la desensibilización funcional y la internalización del receptor en respuesta al agonista (Benya et al., 1995). La fosforilación de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos de acetilcolina parece ser necesaria para el secuestro de estos receptores. Así, la mutación de tres residuos de Thr del extremo carboxi terminal, potencialmente fosforilables, impiden el secuestro del receptor m3 (Yang et al., 1993); la sustitución de dos residuos de Thr de dos sitios consenso de fosforilación para PKA, disminuye la velocidad de internalización del receptor m4 (Van Koppen et al., 1995) y la fosforilación del receptor m2 por GRK2 facilita el secuestro de estos receptores (Tsuga et al., 1994). En otros sistemas, como el receptor de secretina, la internalización del receptor ocurre incluso en ausencia de fosforilación (Holtmann et al., 1996). Cuando este fenómeno se analiza para diferentes receptores muscarínicos (m1, m2, m3 y m4), acoplados a distintas proteínas G, en diversas células, se observa que la pérdida de receptores de la superficie celular en respuesta a agonista depende tanto del subtipo de receptor como del sistema celular donde se expresa (Koenig and Edwardson, 1996).

La vía predominante de internalización inducida por agonista de los receptores acoplados a proteínas G es la vía de clatrina, al menos para los receptores  $\beta_2$ AR (Von Zastrow and Kobilka, 1992), el de colecistoquinina (Roettger et al., 1995), el 5-HT<sub>2A</sub> de serotonina (Berry et al., 1996), el NK1 de neuroquinina (Böhm et al., 1997), el A<sub>1</sub> de adenosina (Gonzalez-Calero et al., 1990, 1992), los D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> de dopamina (Ozaki et al., 1994), el de trombina (Ghinea et al., 1992) y el de hormona luteinizante (Hoxie et al., 1993) y paratiroidea (Huang et al., 1995). Un mecanismo dependiente de caveolina ha sido también propuesto para el receptor  $\beta_2$ AR, el de endotelina-1 ET<sub>A</sub> y el receptor de colecistoquinina (Roettger et al., 1995). En este último caso,

parece que la vía caveolina-dependiente estaría asociada a la rápida resensibilización del receptor, mientras que la vía endocítica clásica, dependiente de clatrina, estaría asociada a una lenta resensibilización y mediaría la *down-regulation* vía lisosomal del receptor.

El secuestro de los receptores a compartimentos intracelulares puede ser importante en dos aspectos: (1) la resensibilización o recuperación de la funcionalidad del receptor y (2) la degradación vía lisosomal de los mismos. Para el  $\beta_2$ AR la inhibición del secuestro no impide la desensibilización funcional, pero si bloquea la desfosforilación y la resensibilización del receptor (Yu et al., 1993; Pippig et al., 1995). Esto indica que la internalización del  $\beta_2$ AR vía endosomal parece ser necesaria para la recuperación de la funcionalidad del receptor. El mecanismo propuesto para la resensibilización del  $\beta_2$ AR se muestra en la figura 9. Las vesículas de internalización que contienen en su membrana los receptores internalizados, se acidifican mediante la bomba de  $H^+$ /ATPasa. La acidificación del medio provoca un cambio conformacional del receptor de manera que se libera el ligando y facilita la interacción del receptor con fosfatasas específicas que lo desfosforilan (Krueger et al., 1997). El receptor desfosforilado puede ser conducido a la membrana celular para su reciclaje (resensibilización) o ser conducido a lisosomas para su degradación (*down-regulation*) (Krueger et al., 1997).

La exposición durante horas o días a agonistas provoca la disminución del número total de receptores de la célula o *down-regulation* del receptor. En condiciones normales, las células no son expuestas por periodos de tiempo largos a hormonas o neurotransmisores ya que éstos una vez producidos son eliminados del medio extracelular (Böhm et al., 1997). La *down-regulation* del receptor puede tener lugar durante circunstancias patológicas, como una continua liberación de hormonas o neurotransmisores de células tumorales o por administración continuada de agonistas durante un tratamiento terapéutico. Por el contrario, la administración de antagonistas produce, en general, un aumento del número de receptores en la membrana o *up-regulation*.

La *down-regulation* de los receptores puede ser consecuencia del aumento de la degradación y/o de la disminución de la síntesis de los receptores. Esta última puede ser debida a la disminución de los niveles de mRNA o de proteína del receptor y/o de las proteínas G (Hadcock and Malbon, 1993). Los dos mecanismos responsables de alterar los niveles de mRNA de los receptores y de las proteínas G son la expresión génica (transcripción) y la estabilidad del mRNA (postranscripción). La velocidad de transcripción, la estabilidad del mRNA del receptor, o ambos, pueden estar modulados por la activación del receptor y/o por los niveles intracelulares de segundos mensajeros. Para la mayoría de receptores se conoce muy poco como ocurren estos



procesos. Se sabe que la exposición a agonistas durante 4-72 h provoca descensos en los niveles de mRNA de varios receptores (Collins et al., 1989, 1991; Hough and Chuang, 1990). En células DDT<sub>1</sub>MF-2, la exposición a tiempos cortos (1-2 h) con agonistas del  $\beta_2$ AR incrementa los niveles de mRNA del receptor (Collins et al., 1989), mientras que si la exposición se prolonga más de 4 h promueve una disminución (50-80 %) de los niveles de mRNA y por lo tanto su *down-regulation* (Hadcock and Malbon, 1993; Hough and Chuang, 1990). Paralelamente, los agentes que incrementan la formación de AMP<sub>c</sub> como la forskolina, provocan una disminución del mRNA del  $\beta_2$ AR (Hadcock and Malbon, 1993; Collins et al., 1989). En este caso, la disminución del contenido de mRNA es debida a la desestabilización del mensajero (Hadcock et al., 1989). Recientemente se ha identificado una proteína citosólica de 35 kDa, denominada  $\beta$ -ARB, que se une selectivamente al mRNA del  $\beta_2$ AR desestabilizándolo (Tholanikunnel et al., 1995). La expresión de esta proteína varía de forma inversa al nivel del mRNA del receptor y, como es lógico, su expresión es inducida por los agonistas del  $\beta_2$ AR. El mecanismo por el cual se regula la expresión de un receptor depende mucho del sistema celular. Así, a diferencia de las células DDT<sub>1</sub>MF-2, en células de glioma de rata C<sub>6</sub>, la exposición a agonista o a forskolina, no afecta a la vida media del mRNA del  $\beta_2$ AR, aunque si disminuye la velocidad de transcripción (Hosoda et al., 1995). La disparidad de estos datos parece indicar que los mecanismos que regulan los niveles de mRNA difieren entre diversas líneas celulares.

#### **2. 4. 6. 2. Características generales de la desensibilización heteróloga**

La pérdida de funcionalidad de un receptor inducida por la activación de otro receptor se denomina desensibilización heteróloga. Este proceso se caracteriza por una regulación cruzada (*cross-regulation*) entre distintas vías de transducción de señal, de manera que la funcionalidad y la expresión de ciertos receptores y proteínas G, se afecta al unirse un agonista a un receptor en principio no relacionado.

Entre los mecanismos más usuales implicados en la desensibilización heteróloga se encuentran aquéllos en los que intervienen las proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros, tales como la PKA y PKC. Estas quinasas al ser activadas pueden producir una modulación negativa sobre el propio sistema que las ha activado (desensibilización homóloga) o sobre otros receptores que poseen secuencias consenso de fosforilación de aquellas (desensibilización heteróloga). El  $\beta_2$ AR posee dos secuencias consenso de fosforilación para la

PKA (Clark et al., 1989), una de las cuales, cuando se fosforila, impide la interacción con la proteína  $G_s$  (Pitcher et al., 1992). La PKC puede también fosforilar al  $\beta_2$ AR en el mismo sitio que la PKA y en un sitio consenso del extremo carboxi terminal, de manera que desacopla el  $\beta_2$ AR de la proteína  $G_s$  (Bouvier et al., 1987). Otros receptores también muestran este tipo de desensibilización. Así, en este grupo se pueden incluir: el receptor de trombina (Brass, 1992), el 5-HT<sub>1A</sub> (Raymond, 1991; Raymond and Olsen, 1994) y el 5-HT<sub>2</sub> de serotonina (Kagaya et al., 1990), el H<sub>1</sub> de histamina (Leurs et al., 1991), el AT<sub>1A</sub> de angiotensina (Oppermann et al., 1996), el m<sub>1</sub> de acetilcolina (Haga et al., 1996) y el del péptido liberador de gastrina (Benya et al., 1995). El panorama puede complicarse más si se tiene en cuenta que las quinasas dependientes de segundos mensajeros pueden participar en la regulación de otras quinasas. Así, en linfocitos T humanos la activación de la PKC *up-regula* las GRK (De Blasi et al., 1995).

La desensibilización heteróloga puede estar mediada también por fosforilación de las proteínas G o por alteraciones en los niveles de éstas. Las proteínas G poseen secuencias consenso de fosforilación por distintas quinasas, lo que sugiere que la fosforilación puede ser un mecanismo de regulación de estas proteínas. La proteína  $G_{\alpha i}$  puede ser fosforilada por la PKC y por otra quinasa dependiente de AMP<sub>c</sub> (Bushfield et al., 1991), lo que inactiva a la proteína y por tanto a las vías de señalización en las que interviene. La proteína  $G_{\alpha s}$  se fosforila *in vitro* por la PKC (Pyne et al., 1992) y por tirosinas quinasas de la familia src (Moyers et al., 1995).

En células DDT<sub>1</sub>MF-2, la inhibición de la adenilato ciclasa a través de la activación de los receptores A<sub>1</sub> con el agonista R-PIA, provoca un incremento en la expresión del  $\beta_2$ AR (Hadcock et al., 1991). De esta manera, la activación de la vía inhibidora de la adenilato ciclasa provoca un aumento de la estimulación de la vía contraria. En este proceso se produce una *down-regulation* de las proteínas  $G_{\alpha i2}$  y del receptor A<sub>1</sub>, mientras que no se modifican los niveles de  $G_{\alpha s}$ . Por otro lado, la estimulación de las células con forskolina o con agonistas del receptor  $\beta_2$ AR provocan efectos contrarios, es decir, disminuyen los niveles de  $G_{\alpha s}$  y aumentan los de  $G_{\alpha i2}$  (Hadcock et al., 1990).

#### 2. 4. 6. 3. Desensibilización del receptor A<sub>1</sub>

Los mecanismos implicados en la regulación de la expresión del receptor A<sub>1</sub> de adenosina han sido mucho menos estudiados que en el caso del  $\beta_2$ AR. La regulación del receptor A<sub>1</sub> se ha analizado tanto en animales (*in vivo*) como en cultivos celulares (*in vitro*).

El tratamiento de ratas con el agonista R-PIA durante días provoca una disminución de la capacidad de los agonistas del receptor  $A_1$  para inhibir la adenilato ciclasa, lo que sugiere que durante el tratamiento el receptor  $A_1$  se desensibiliza (Green, 1987; Longabaugh et al., 1989). Ese tratamiento provoca una pérdida del número de receptores  $A_1$  en adipocitos (47%) (Longabaugh et al., 1989), en miocitos (52 %) (Lee et al., 1993) y en cerebro (60 %) (Ruiz et al., 1996). Mediante estudios de unión de ligandos se observa el desacoplamiento entre el receptor y la proteína  $G_{\alpha i}$ , de manera que disminuye el porcentaje de receptores en estados de alta afinidad (Longabaugh et al., 1989). En los tejidos mencionados se observa que la desensibilización va acompañada de una disminución en los niveles de las proteínas  $G_{\alpha i1-2}$  y un aumento de la  $G_{\alpha s}$  (Longabaugh et al., 1989; Ruiz et al., 1996). Sin embargo, no se observan variaciones de mRNA del receptor  $A_1$  y de las proteínas G, por lo que la *down-regulación* que se observa en estos casos se produce a nivel postranscripcional y/o postraducciona (Longabaugh et al., 1989; Fernandez et al., 1996). Se han obtenido resultados similares en el sistema atrioventricular de cobaya, en el cual el tratamiento durante 6 días con R-PIA, provoca una disminución del número de receptores  $A_1$ , del número de receptores en estados de alta afinidad y una disminución del 46 % y 80 % en la concentración de proteínas  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$ , respectivamente (Dennis et al., 1995).

El tratamiento de adipocitos de rata en cultivo con el agonista R-PIA provoca una menor eficacia de los agonistas del receptor  $A_1$  para inhibir la lipólisis y la adenilato ciclasa, y un descenso del 58 % de los sitios de unión del receptor  $A_1$  (Green, 1987; Green et al., 1992). Además, el tratamiento con R-PIA provoca una disminución de los niveles de las proteínas  $G_{\alpha i1,3}$  y  $G_{\alpha i2}$  del 90 % y 50 % , respectivamente (Green et al., 1990, 1992). La exposición de los adipocitos de rata a la R-PIA provoca una disminución de la sensibilidad tanto a la R-PIA como a la prostaglandina  $E_1$  lo que indica que la *down-regulation* de las proteínas  $G_{\alpha i}$  inducida por la R-PIA desensibiliza de forma heteróloga el receptor de prostaglandina (Green et al., 1992).

En células DDT<sub>1</sub>MF-2, el tratamiento con R-PIA (24 h) produce una disminución del 50% de la capacidad de inhibición de la adenilato ciclasa por agonistas, una disminución del número total de sitios de unión del 40% y una disminución del 22 % del estado de alta afinidad del receptor (Ramkumar et al., 1991). La saturación del receptor con R-PIA no provoca cambios en la concentración de las proteínas  $G_{\alpha i2}$  y  $G_{\alpha s}$ , por lo que la desensibilización del receptor  $A_1$  probablemente es debida al desacoplamiento de éste con la proteína  $G_i$ .

El tratamiento de cortes de estriado de cerebro con el agonista CPA produce una rápida (15-30 min) desensibilización funcional del receptor  $A_1$  (Abbracchio et al., 1992). Durante 1 h de

exposición a CPA no se observa la reducción del número total de receptores  $A_1$ , lo que sugiere que el desacoplamiento del receptor  $A_1$  de su sistema efector es el responsable de la pérdida de funcionalidad (Abbracchio et al., 1992). El tratamiento de células granulares de cerebelo con los agonistas CPA o CHA provoca, también, una reducción dependiente del tiempo y de la dosis, de los sitios de unión (~ 45 %) y del estado de alta afinidad (30 %), además del desacoplamiento funcional del receptor  $A_1$  y la adenilato ciclasa (Hettinger-Smith et al., 1996; Vendite et al., 1998). Si las células se incuban durante 24-48 h con el agonista no se observan cambios en la concentración de mRNA del receptor, pero sí un aumento de receptores  $A_1$  en microsomas lo que explicaría que la *down-regulation* del receptor tiene lugar a nivel postranscripcional, probablemente vía lisosomal (Vendite et al., 1998). Además, este tratamiento disminuye los niveles de proteínas  $G_{\alpha 1,2}$  en la membrana plasmática y en la fracción vesicular, lo que sugiere un incremento de la vía degradativa de estas proteínas (Vendite et al., 1998).

Por otro lado, al exponer las mismas células a los antagonistas cafeína y 8-*p*-sulfofenilteofilina se observa un aumento del número de receptores en la célula (*up-regulation*) y una mayor inhibición de la adenilato ciclasa a través del receptor  $A_1$  (Hettinger-Smith et al., 1996). Estos datos coinciden con otros estudios en los que el tratamiento con cafeína de células LLC-PK<sub>1</sub> y OK o su administración en ratas durante días provoca el aumento del número de receptores  $A_1$  y un mayor acoplamiento con la proteína  $G_{\alpha i}$  (Fastbom and Fredholm, 1990; Coulson et al., 1996).

Si bien la desensibilización del receptor  $A_1$  ha sido estudiada en numerosos tejidos y células, ha recibido una atención menor el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de este receptor. Uno de los fenómenos involucrados en la desensibilización es la fosforilación del receptor (vease apartado 2.4.6.1). El receptor  $A_1$  contiene en el tercer y segundo bucle intracelular sitios consenso de fosforilación para la PKA y PKC (Olah et al., 1992; Stiles, 1992). En células DDT<sub>1</sub>MF-2 y en cerebro bovino, el receptor  $A_1$  se fosforila en presencia del agonista R-PIA (Ramkumar et al., 1991, 1993). El receptor  $A_1$  purificado de cerebro bovino y reconstituido en vesículas es también fosforilado por la GRK2 (Ramkumar et al., 1993). Las consecuencias funcionales de la fosforilación por la GRK2 son la reducción (50 %) de la unión del agonista APNEA, el aumento de la unión del antagonista XAC, una reducción de la estimulación de la actividad GTPasa por la R-PIA y una disminución de la activación de la unión del GTPγS a las membranas (Ramkumar et al., 1993). Estos resultados sugieren que la

fosforilación del receptor  $A_1$  está involucrada en el proceso de desensibilización al menos en este sistema reconstituido.

La cinética de desensibilización y *down-regulation* del receptor  $A_1$  es mucho más lenta que la de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_3$  (Palmer et al., 1994, 1996). En los receptores  $\beta$  adrenérgicos también se han hallado diferencias en la velocidad de desensibilización (Chambers et al., 1994; Marullo et al., 1995). Así los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  se desensibilizan e internalizan más rápidamente que el  $\beta_3$ . Este comportamiento diferente se ha atribuido a la susceptibilidad del extremo carboxi terminal de estos receptores a ser fosforilados por Ser/Thr quinasas. El  $\beta_3$  no contiene residuos de Ser o Thr en el extremo carboxi terminal, lo que justificaría las diferencias observadas. Por otro lado, el extremo carboxi terminal de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_3$  está involucrado en la desensibilización a corto plazo de estos receptores (Palmer et al., 1996; Palmer and Stiles, 1997). La ausencia de Ser o Thr en la región final del extremo carboxi terminal del receptor  $A_1$ , potencialmente fosforilables por PKA, PKC y GRK2 y las cuales están presentes en los otros receptores de adenosina, podría explicar las diferencias observadas en el receptor  $A_1$  (Palmer and Stiles, 1997).

### **3. RESULTADOS**

**3.1. Adenosine deaminase interacts with A<sub>1</sub> adenosine receptors in pig brain cortical membranes.**

Carles Saura, Francisco Ciruela, Vicent Casadó, E. I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís and Rafael Franco.

*Journal of Neurochemistry.* **66**, 1675-1682 (1996).

# Adenosine Deaminase Interacts with A<sub>1</sub> Adenosine Receptors in Pig Brain Cortical Membranes

Carles Saura, Francisco Ciruela, Vicent Casadó, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís, and Rafael Franco

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

**Abstract:** Adenosine deaminase is an enzyme of purine metabolism that has largely been considered to be cytosolic. A few years ago, adenosine deaminase was reported to appear on the surface of cells. Recently, it has been demonstrated that adenosine deaminase interacts with a type II membrane protein known as either CD26 or dipeptidylpeptidase IV. In this study, by immunoprecipitation and affinity chromatography it is shown that adenosine deaminase and A<sub>1</sub> adenosine receptors interact in pig brain cortical membranes. This is the first report in brain demonstrating an interaction between a degradative ectoenzyme and the receptor whose ligand is the enzyme substrate. By means of this interaction adenosine deaminase leads to the appearance of the high-affinity site of the receptor, which corresponds to the receptor-G protein complex. Thus, it seems that adenosine deaminase is necessary for coupling A<sub>1</sub> adenosine receptors to heterotrimeric G proteins. **Key Words:** Adenosine deaminase—A<sub>1</sub> adenosine receptors—Pig brain—Cerebral cortex—Ligand binding—Coprecipitation—Protein-protein interactions—G proteins—Receptor-G protein complex.

*J. Neurochem.* 66, 1675–1682 (1996).

Adenosine, acting through specific receptors located on the surface of cells, is capable of exerting multiple physiological actions in various systems (Olah and Stiles, 1992; Tucker and Linden, 1993; Dalziel and Westfall, 1994). In the nervous system, adenosine behaves as a neuromodulator, inhibiting neuronal firing (Phillis and Wu, 1981) and synaptic transmission (Kuroda, 1978) and altering cyclic AMP levels (Daly, 1977). Four receptor types (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, and A<sub>3</sub>) have been cloned, which are heptaspanning proteins coupled to G proteins. A<sub>1</sub> adenosine receptors (A<sub>1</sub>Rs) are heterogeneously distributed throughout the CNS, with the cerebral cortex being a zone where they concentrate (Fastbom et al., 1987a,b). In brain membranes, as in membranes from other sources, A<sub>1</sub>Rs present two different affinities for agonists that depend on the coupling to heterotrimeric G proteins (Lohse et al., 1984); coupled receptor-G protein complexes display high affinity for (R)-N<sup>6</sup>-(phenylisopropyl)-

adenosine (R-PIA;  $K_D = 0.1-0.2$  nM), whereas uncoupled receptors display low affinity ( $K_D = 1-2$  nM) (Lohse et al., 1984; Casadó et al., 1990). Functional assays to study A<sub>1</sub>Rs are usually performed using metabolically stable synthetic ligands that could mimic the effects of the physiological ligand, adenosine. In experiments of ligand binding to A<sub>1</sub>Rs or of second messenger production via A<sub>1</sub>Rs, ADA is always added to the incubation mixtures to degrade endogenous adenosine, which behaves as a competitor.

Adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) catalyzes the hydrolytic deamination of adenosine to inosine. Although the location of the enzyme is mainly cytosolic, ADA is also found associated to membrane fractions. Thus, in membranes from cultured brain cells Trams and Lauter (1975) described a similar enrichment of ADA and the ectoenzyme 5'-nucleotidase, which produces adenosine from AMP. In 1986 we demonstrated that ADA was present on the surface of rat brain synaptosomes with the same topology as that of ecto-5'-nucleotidase (Franco et al., 1986). Since then, ADA has been implicated in the control of the extracellular concentration of adenosine together with the enzymes that produce the nucleoside and the nucleoside transport systems present on the cell surface. Ecto-ADA was known to associate to the ADA binding protein, which is an integral membrane protein present in many species and tissues (Hartelschen et al., 1991; Schrader et al., 1994; Fleischer, 1994), including pig brain (Barnes et al., 1994). Kameoka et al. (1993) have reported that ADA on the surface of T cells binds

Received August 31, 1995; revised manuscript received November 7, 1995; accepted November 7, 1995.

Address correspondence and reprint requests to Dr. R. Franco at Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Martí i Franquès 1, 08028 Barcelona, Spain.

**Abbreviations used:** ADA, adenosine deaminase; A<sub>1</sub>R, A<sub>1</sub> adenosine receptor; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; R-PIA, (R)-N<sup>6</sup>-(phenylisopropyl)adenosine; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS-TI, 50 mM Tris buffer containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20; TBS-TII, 10 mM Tris buffer containing 500 mM NaCl and 0.5% Tween-20; TSA buffer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 150 mM NaCl.



to the activation marker CD26, which is also known as dipeptidylpeptidase IV.

Although an obvious role for ecto-ADA is to degrade endogenous adenosine, other possible roles are under scrutiny. Thus, Catania et al. (1991) have demonstrated that ADA is able to stimulate the release of excitatory amino acids through a mechanism that is independent of adenosine depletion. We have demonstrated that ecto-ADA binding to CD26 produces a costimulatory response in human T cell activation events that is independent of its catalytic activity (Martín et al., 1995). In this report we provide evidence that ADA and A<sub>1</sub>Rs interact in pig brain membranes. Through this interaction, i.e., in a catalytic-independent manner, ADA modifies the binding of the agonist R-[<sup>3</sup>H]PIA to A<sub>1</sub>Rs. Because ADA leads to the appearance of the high-affinity component for ligand binding, it seems that ADA is needed for an efficient coupling of A<sub>1</sub>Rs to heterotrimeric G proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

R-[adenine-2,8-<sup>3</sup>H, ethyl-2-<sup>3</sup>H]PIA (36 Ci/mmol), Na<sup>125</sup>I (17 mCi/ $\mu$ g of iodine), and the ECL immunoblotting detection system were purchased from Amersham (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). 1,3-[<sup>3</sup>H]Dipropyl-8-cyclopentyl-xanthine ([<sup>3</sup>H]DPCPX; 108 Ci/mmol) was from New England Nuclear Research Products (Boston, MA, U.S.A.). DPCPX was from Research Biochemicals International (Natick, MA, U.S.A.). R-PIA, R-deoxycoformycin, polyethylenimine (50%), bovine  $\gamma$ -globulins, bovine serum albumin, and rabbit anti-mouse IgG were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Calf ADA, which was filtered through Sephadex G-25 before all assays, CHAPS, and electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). CNBr-activated Sepharose and Sephadex G-50 fine grade were from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). All other products were of the best grade available and were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Deionized water further purified with a Millipore Milli-Q system was used throughout.

### Antigens and antibodies

Antipeptide antisera against A<sub>1</sub>Rs were generated by immunization of female New Zealand white rabbits (Ciruela et al., 1995). The peptides used for immunization were synthesized by the Peptide Synthesis Service of the University of Barcelona (Spain). The peptide that corresponds to part of the third intracellular loop of the rat A<sub>1</sub>R (to give PC11 antibody) was KKVSASSGDPQKYKGKELK. The peptide that corresponds to part of the second extracellular loop of the rat A<sub>1</sub>R (to give PC21 antibody) was GEPVIKAEFEKVIS. The composition of the peptide was determined by amino acid analysis. Purity of each of the peptides was >85% as determined by reverse-phase HPLC. The antisera generated were purified by affinity chromatography using the specific peptide coupled to Sepharose. The specificity of anti-A<sub>1</sub>R antibodies was tested as described elsewhere (Ciruela et al., 1995). PC11 and PC21 were not able to recognize ADA from a calf intestine commercial soluble preparation by immunoprecipitation and western blotting.

Anti-ADA was affinity-purified from specific antisera raised by immunization of female New Zealand white rabbits as described elsewhere (Arán et al., 1991).

### Membrane preparation and solubilization

Porcine brains were obtained from the local slaughterhouse. Brain cortices were dissected on ice and washed with 0.25 M sucrose containing 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Tissue homogenization was performed in 10 volumes of the above ice-cold sucrose buffer with a Polytron (Kinematica; PTA 20TS rotor; setting of 4) for two periods of 5 s. The homogenate was centrifuged at 105,000 g for 30 min at 4°C, and the pellet was resuspended in 10 volumes of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and recentrifuged under the same conditions. The pellet was washed once more as described above and resuspended in the same buffer solution for immediate use.

Receptor solubilization was performed as described by Casadó et al. (1990). Cortical membranes were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.5% (wt/vol) CHAPS and 0.5% (wt/vol) digitonin (the detergent/protein ratio was 2). After incubating for 15 min at 25°C, the suspension was centrifuged at 105,000 g for 90 min at 4°C. The supernatant filtered through Millipore filters (pore size, 0.22  $\mu$ m) constituted the receptor-solubilized fraction.

### Enzyme activities

ADA (EC 3.5.4.4) and lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.29) were assayed using, respectively, adenosine and pyruvate and NADH as substrates, as described elsewhere (Franco et al., 1986).

### Protein content determination

Protein was quantified according to the method of Lowry et al. (1951). Bovine serum albumin was used as the standard.

### Adenosine content determination

Washed brain cortical membranes (1.2 mg of protein/ml) were incubated for 3 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Samples performed in triplicates were deproteinized by incubation with 1.2 M perchloric acid at 0°C during 10 min. Samples were then centrifuged, and the supernatants were delipidated by addition of 1 volume of a mixture of heptane/Freon (1:4, vol/vol) and neutralized with 1.2 M KOH solution. Twenty microliters of the aqueous phase (or standard solution containing ATP, ADP, AMP, IMP, adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine) was analyzed by HPLC using a Shimadzu model LC-6A system with a model SPD-6A UV spectrophotometric detector by the method described by Sayós et al. (1994).

### Radioiodination of calf ADA

Calf intestinal ADA filtered through Sephadex G-25 was radiolabeled with <sup>125</sup>I by the chloramine-T method described by Daddona and Kelley (1978), except that the reaction product (<sup>125</sup>I-ADA) was separated from free <sup>125</sup>I with a Sephadex G-50 fine-grade column; elution was performed with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. Aliquots displaying ADA activity (1.8  $\times$  10<sup>7</sup> dpm/U) were pooled and stored at 4°C. Seventy-five percent of the enzyme activity was recovered.

### Binding assays

R-[<sup>3</sup>H]PIA and [<sup>3</sup>H]DPCPX binding assays were carried out after incubation of the pig brain cortical membranes or the solubilized receptor suspensions (0.7 mg of protein/ml)

with 0.2 U/ml of ADA for 1 h at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. After the incubation mixtures had stood at 25°C for long enough to achieve the equilibrium for each radioligand concentration (0.5 h for the highest concentration and 8 h for the lowest concentration; 2 h in the case of 1.5 nM  $R$ -[<sup>3</sup>H]PIA), free ligand was separated from bound ligand by rapid filtration. Five hundred microliters of membrane suspensions was passed through Whatman GF/C filters presoaked in 0.3% polyethylenimine (2 h, pH 10), which were subsequently washed with 10 ml of ice-cold Tris-HCl buffer for <8 s. In the case of solubilized receptor, 500  $\mu$ l was added to a mixture of polyethylene glycol 8000 and bovine  $\gamma$ -globulins to a final concentration of 10% (wt/vol) and 1.3 mg/ml, respectively. After further incubation for 15 min at 0°C the suspension was passed through Whatman GF/C filters (presoaked in 0.3% polyethylenimine) and washed with 10 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 8% polyethylene glycol 8000. Nonspecific binding was determined in the presence of an excess of  $R$ -PIA (300-fold) and DPCPX (500-fold) in binding assays corresponding to  $R$ -[<sup>3</sup>H]PIA and [<sup>3</sup>H]DPCPX, respectively.

<sup>125</sup>I-ADA binding assays were performed with 0.75 mg of protein/ml of pig brain membranes in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. After standing at 25°C for long enough to achieve the equilibrium for each <sup>125</sup>I-ADA concentration (0.5 h for the highest and 2 h for the lowest), aliquots of 200  $\mu$ l were filtered through Whatman GF/C filters and subsequently washed in 5 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer.

In all cases, the filters were placed in 10-ml vials containing Formula-989 cocktail (New England Nuclear Research Products) and shaken overnight; radioactivity in the vials was counted using a Packard model 1600 Tri-Carb scintillation counter with 50% efficiency.

#### Analysis of binding data

The individual saturation isotherms were analyzed by nonlinear regression as described elsewhere (Casadó et al., 1990). The total binding data (specific binding to  $A_1R$  plus nonspecific binding) were fitted to one- and two-affinity states according to the following equations:

$$\text{Total binding} = R \cdot L / (K_D + L) + K_n \cdot L$$

for one affinity state

Total binding

$$= R_H \cdot L / (K_{DH} + L) + R_L \cdot L / (K_{DL} + L) + K_n \cdot L$$

for two affinity states

where  $L$  represents free radioligand concentration calculated as radioligand added minus radioligand bound,  $K_n$  denotes the constant for nonspecific binding,  $R$ ,  $R_H$ , and  $R_L$  are the maximal number of binding sites in either the one-state or the two-state (high [ $R_H$ ] and low [ $R_L$ ] affinity) model, and  $K_D$ ,  $K_{DH}$ , and  $K_{DL}$  are the equilibrium dissociation constants for individual receptor species in the two models. Three to five replicates of each point were performed. Goodness of fit was tested according to reduced  $\chi^2$  or SD values given by the regression program. A modified  $F$  test was used to analyze whether the fit to the two-state model significantly improved on the fit to the one-state model. In all cases it was considered that the two-state model led to a significant improvement over the one-state model when  $p < 0.001$ . When no significant improvement over the one-state model was detected, the  $p$  values were  $>0.30$  (Hoyer et al., 1984).

#### Chromatography of $A_1R$ using an ADA-affinity column

Solubilized extracts (2 mg of protein/ml of 0.5% CHAPS and 0.5% digitonin in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) obtained from pig cortical membranes were diluted (1:2) with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and applied to a 1-ml ADA-affinity column at a flow rate of 2.5 ml/h at room temperature. The ADA-affinity column was prepared by direct coupling of 10 mg of commercial calf intestinal ADA [filtered through Sephadex G-25 and further purified to homogeneity by affinity chromatography (Arán et al., 1990)] to 1 g of cyanogen bromide-activated Sepharose as described by Trotta et al. (1979). After the application, the column was cooled to 4°C and washed with 15 volumes of 50 mM Tris-HCl containing 0.1% CHAPS and 0.1% digitonin (pH 7.4) until no protein was detected in the eluates. All fractions were assayed for  $R$ -[<sup>3</sup>H]PIA binding, lactate dehydrogenase activity, and protein.

#### Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting

Samples were treated with SDS-PAGE sample buffer (62 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue, pH 6.8) for 5 min at 100°C before loading onto the polyacrylamide gels. Electrophoresis was performed according to the method of Laemmli (1970) using homogeneous slab gels—15% acrylamide separating gel and 4% acrylamide concentrating gel—that were electrophoresed at constant voltage (200 V). Proteins were transferred to PVDF membranes (Immobilon-P; Millipore) over 1 h at a current of 15 mA, using a semidry Bio-Rad Trans-Blot, in Towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, and 0.1% SDS, pH 8.3) (Towbin et al., 1979). Nonspecific protein binding sites on the PVDF membranes were blocked by incubation overnight at 4°C using 5% (wt/vol) bovine serum albumin in 50 mM Tris buffer containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20 (TBS-TI; pH 7.4) plus 0.02% NaN<sub>3</sub>. After blocking, PVDF membranes were washed twice (10 min per wash) in 10 mM Tris-HCl buffer containing 500 mM NaCl and 0.5% Tween-20 (TBS-TII; pH 7.4) and incubated for 3 h with the specific purified anti- $A_1R$  antibody, PC21 (10  $\mu$ g/ml), or purified anti-ADA antibody (10  $\mu$ g/ml) in TBS-TII, including 0.02% NaN<sub>3</sub>. The filters were washed three times with TBS-TII before incubation for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG diluted 1:15,000 in TBS-TI. The filters were washed five times with TBS-TII as described above and incubated in equal volumes of ECL detection reagent 1 and 2 (Amersham). The reagent was drained off, and the filters were placed in contact with a film (Agfa Curix-Rp2), which was developed by chemiluminescence. The usual time for visualizing immunoreactive bands was 1 min.

#### Immunoprecipitation of ADA

Cortical membranes from pig brain were resuspended and solubilized in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl (TSA buffer), 0.02% NaN<sub>3</sub>, and 1% Nonidet-P40 (1 h, 4°C) in the presence of 2 U/ml of ADA either fully active or inhibited using Hg<sup>2+</sup> or deoxycoformycin. In the immunoprecipitation procedure CHAPS-digitonin detergent was discarded to avoid artifactual charge effects in protein-protein interactions. For the Hg<sup>2+</sup>-dependent blockade of the deaminase activity a preincubation of 1 h with 0.1 mM HgCl<sub>2</sub> was performed; free Hg<sup>2+</sup> was removed by gel filtration using

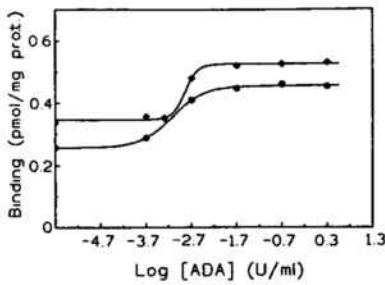


FIG. 1. Effect of ADA on agonist ( $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA) and antagonist ( $[^3\text{H}]$ DPCPX) binding to pig brain cortical membranes. Binding of agonist (1.5 nM  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA; ●) and antagonist (1.5 nM  $[^3\text{H}]$ DPCPX; ◆) to crude membranes was performed as described in Materials and Methods. Pig brain cortical membranes were incubated in the presence of ADA (1 h, 25°C) before the binding of ligands. Data are mean  $\pm$  SEM values of four separate replicates (the error bar is included within the symbols). Data points on the y-axis correspond to the binding in the absence of ADA.

Sephadex G-25. Deoxycoformycin (0.1  $\mu\text{M}$ ) was included in the solubilization mixture. The solubilized preparation was centrifuged at 105,000  $g$  for 90 min at 4°C to pellet insoluble material. The solubilized material (1 mg of protein/ml) was then incubated with the specific purified antibodies PC11, PC21, and anti-ADA (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in TSA buffer that included 1% Nonidet P-40. Nonspecific immunoprecipitation was performed by using the same amount of a rabbit anti-mouse IgG. Immune complexes were allowed to form overnight at 4°C with constant rotation. Protein A-Sepharose CL-4B (40  $\mu\text{l}$ ) was then added and incubated for 2 h, at 4°C, with constant rotation. Immunoprecipitates were washed once with 1% Nonidet-P40 in TSA buffer and once with 0.1% Nonidet-P40 in TSA buffer. Samples were incubated with 60  $\mu\text{l}$  of 10-fold concentrated SDS-PAGE sample buffer and treated for 10 min at 100°C. SDS-PAGE was performed as described above.

## RESULTS

The modification by ADA of the binding of synthetic agonists to  $A_1$ Rs has been explained assuming that the enzyme degrades the endogenous ligand, adenosine (Linden, 1989). The level of endogenous adenosine in a preparation of pig brain membranes, determined by HPLC (see Materials and Methods), is very low (<25 nM), and thus it is unlikely that endogenous adenosine affects the binding of the agonist  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA to these membranes. Therefore, in this system, the presence of ADA should not affect the agonist binding to the receptor. To analyze whether this was true, the effect of ADA on agonist and antagonist binding to  $A_1$ Rs was assayed in pig cerebral cortex membranes. Either the agonist ( $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA) or the antagonist ( $[^3\text{H}]$ DPCPX) binding was enhanced by ADA, with  $EC_{50}$  values of 0.67 mU/ml for agonist binding and 1.51 mU/ml for antagonist binding (Fig. 1). The specificity of ADA in enhancing agonist binding was tested by determining the 1 nM  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding in the absence (0.18 pmol/mg of protein) and in the presence of bovine  $\gamma$ -globulins (0.23, 0.22, and 0.19 pmol/mg

of protein with 0.13, 1.3, and 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively). Thus, the presence of  $\gamma$ -globulins in a concentration up to 100-fold greater than that of ADA had no effect in agonist binding. The equilibrium binding analysis of  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA to crude membranes in the absence of ADA was consistent with the existence of a single low-affinity state ( $K_D = 4.1$  nM). Addition of ADA did not modify  $B_{\text{max}}$  but resulted in the conversion of 37% of the low-affinity state into a high-affinity site ( $K_D = 0.22$  nM; Table 1). The Scatchard plot of  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding in the absence of ADA is linear, whereas that obtained in the presence of the enzyme indicates the existence of two components for the binding (Fig. 2). Thus, the classical distribution of  $A_1$ Rs into two affinity sites, one uncoupled (low affinity) and the other coupled (high affinity) to heterotrimeric G proteins, is only evident when ADA is present in the assays. It is unlikely that endogenous adenosine is responsible for the disappearance of the high-affinity component of  $A_1$ Rs. In fact, if the change in the equilibrium binding parameters shown in Table 1 is due to the presence of 25 nM adenosine, it will be easily deduced that the receptor binding site affinity for adenosine must be <7 nM. This does not fit with the  $IC_{50}$  values for adenosine as a displacer of  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding to an  $A_1$ R of the same kinetic behavior ( $IC_{50} = 0.13$  mM for the high-affinity component and 2.7 mM for the low-affinity component in DDT<sub>1</sub>-MF2 cells; manuscript in preparation). Also, ADA was still able to induce a 29% increase in the binding of 0.2 nM  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA to membranes that were preincubated with 0.2 U/ml of ADA and thoroughly washed afterward; in this latter case, adenosine in the binding medium was not detected by HPLC.

These results suggested that ADA might modulate agonist binding to pig brain membranes in a catalytic-independent manner. To analyze whether this explanation was correct,  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding experiments were carried out in the presence of either fully active ADA or enzymatically inactive ADA. The inhibitors used were  $R$ -deoxycoformycin and  $\text{Hg}^{2+}$ , each of which completely blocked the enzymatic activity at the concentrations used. The ADA-dependent increase of  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding was seen in the case of fully active enzyme and also in the case of  $\text{Hg}^{2+}$ -inhibited ADA (Fig. 3). In the presence of  $\text{Hg}^{2+}$ -inhibited ADA it was possible to detect the two affinity states of  $A_1$ Rs, with equilibrium binding parameters similar to those obtained using active ADA (Table 1).  $\text{Hg}^{2+}$  by itself did not have any effect on  $R$ - $[^3\text{H}]$ PIA binding to membranes. Therefore,  $\text{Hg}^{2+}$  was able to block activity without affecting the ADA-induced appearance of the high-affinity form of  $A_1$ Rs. It is interesting that  $R$ -deoxycoformycin, the irreversible inhibitor of the enzyme, prevented the appearance of the second affinity state because the results obtained were similar to those found in the absence of ADA (Table 1). Thus,  $R$ -deoxycoformycin blocked both enzyme activity and the appearance of the high-affinity form of the receptor.

**TABLE 1.** Effect of ADA, active or inhibited by either deoxycoformycin (DCF) or Hg<sup>2+</sup>, on the R-[<sup>3</sup>H]PIA equilibrium binding parameters

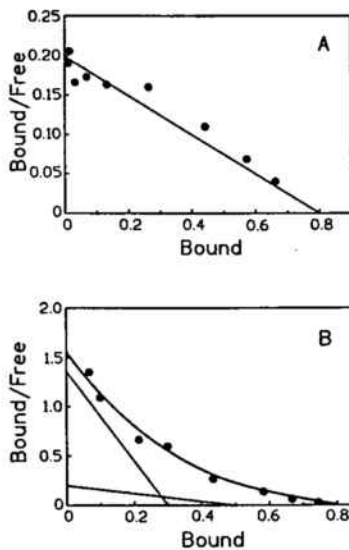
ADA	Inhibitor		K <sub>D</sub> (nM)		B <sub>max</sub> (pmol/mg of protein)	
	DCF	Hg <sup>2+</sup>	Low-affinity	High-affinity	Low-affinity	High-affinity
-	-	-	4.1 ± 0.5	—	0.80 ± 0.09	—
+	-	-	2.6 ± 0.9	0.22 ± 0.09	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
-	+	-	2.8 ± 0.1	—	1.01 ± 0.02	—
+	+	-	3.16 ± 0.02	—	0.71 ± 0.02	—
-	-	+	4.4 ± 0.7	—	0.8 ± 0.1	—
+	-	+	3.6 ± 0.5	0.25 ± 0.06	0.55 ± 0.09	0.51 ± 0.06

Binding parameters were derived from saturation experiments carried out with R-[<sup>3</sup>H]PIA in the absence or in the presence of 0.02 U/ml of ADA (active or inactivated by preincubation of 2 U/ml with 0.1 mM DCF or 10 μM Hg<sup>2+</sup>). Data were fitted to a one- or two-affinity-state model by a nonlinear regression program (see Materials and Methods). Data are mean ± SD values given by the regression program.

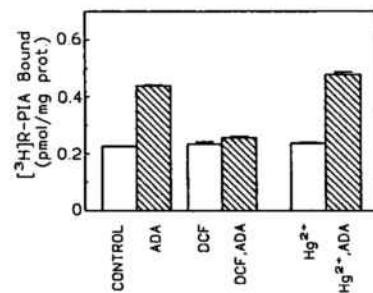
This effect was probably due to the fact that deoxycoformycin prevents the interaction between ADA and membranes (see below).

To modify agonist binding to A<sub>1</sub>Rs, ADA must interact with membranes. Iodinated ADA binds to pig brain cortical membranes with a K<sub>D</sub> value of 230 nM and a B<sub>max</sub> of 2.9 pmol/mg of protein (Fig. 4). In these membranes an interaction between ADA and A<sub>1</sub>Rs occurred, as demonstrated by coimmunoprecipitation. We have developed two different antipeptide anti-A<sub>1</sub>R antibodies (PC11 and PC21) that immunoprecipitate pig brain cortex A<sub>1</sub>Rs photolabeled with <sup>125</sup>I-R-PIA and recognize the 39-kDa band of the receptor by west-

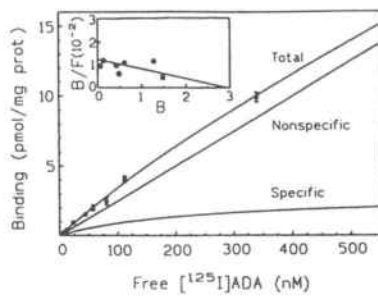
ern blotting (Ciruela et al., 1995). Immunoprecipitation of A<sub>1</sub>Rs from detergent extracts using these specific antibodies (see Materials and Methods) also yielded the 44-kDa band corresponding to ADA (Fig. 5A). The same kind of experiment described in Fig. 5A was performed with ADA inhibited by Hg<sup>2+</sup> and by deoxycoformycin. The coimmunoprecipitation of ADA and A<sub>1</sub>Rs was also possible when ADA was inhibited by Hg<sup>2+</sup>, but the band of coprecipitated ADA disappeared when deoxycoformycin was used in the assays (Fig. 5B). Thus, deoxycoformycin prevents the interaction between the enzyme and the receptor. On the other hand, an ADA-Sepharose column retained 62% of the R-[<sup>3</sup>H]PIA binding sites of membrane detergent extracts, whereas there was no retention of lactate dehydrogenase, which was used as the control protein (Fig. 6A). Elution of the A<sub>1</sub>R molecules retained in the column, as shown by immunoblotting (Fig. 6B), was only possible using SDS-containing buffers. These results clearly demonstrate that an inter-



**FIG. 2.** Scatchard plots of the R-[<sup>3</sup>H]PIA computer-derived specific binding data to pig brain membranes in the presence or in the absence of ADA. Binding of R-[<sup>3</sup>H]PIA to cortical membranes was performed without (A) or with (B) ADA (0.02 U/ml) as described in Materials and Methods. All points represent the mean of four replicates. The data were fitted using a nonlinear regression program to a one-site (A) or two-site (B) model. In the first case there was no significant improvement after considering the two-site model (see Materials and Methods).



**FIG. 3.** Effect of ADA inhibitors on binding of the agonist R-[<sup>3</sup>H]PIA to pig brain cortical membranes. ADA completely inhibited by either deoxycoformycin (DCF) or Hg<sup>2+</sup> was preincubated (final concentration, 0.02 U/ml) with brain cortical membranes for 1 h at 25°C before the binding of R-[<sup>3</sup>H]PIA (1.3 nM) as indicated in Materials and Methods. Nonspecific binding was determined in the presence of 600 nM R-PIA. The final concentrations of the reagents in the incubation mixtures were 0.1 μM DCF and 0.1 μM Hg<sup>2+</sup>. Data are mean ± SEM (bars) values of four separate experiments.

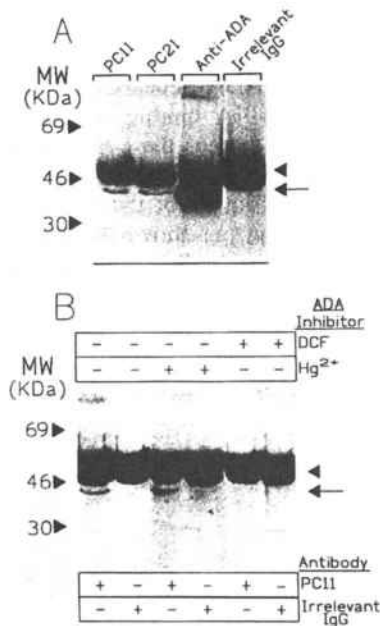


**FIG. 4.** Equilibrium binding isotherm of  $^{125}\text{I}$ -ADA to pig brain cortical membranes. Membranes (0.75 mg/ml) were incubated with  $^{125}\text{I}$ -ADA in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 25°C as described in Materials and Methods. Nonspecific binding was determined in the presence of a 200-fold excess of unlabeled ADA. Data are mean  $\pm$  SEM (bars) values of four replicates. **Inset:** Scatchard plot of the computer-derived specific binding data. The plot was linear, with a  $K_D$  of  $230 \pm 30$  nM and a  $B_{\text{max}}$  of  $2.9 \pm 0.2$  pmol/mg of protein.  $B$  represents specific binding, and  $F$  represents free ligand concentration.

action between ADA and  $A_1$ R occurs in pig brain cortical membranes.

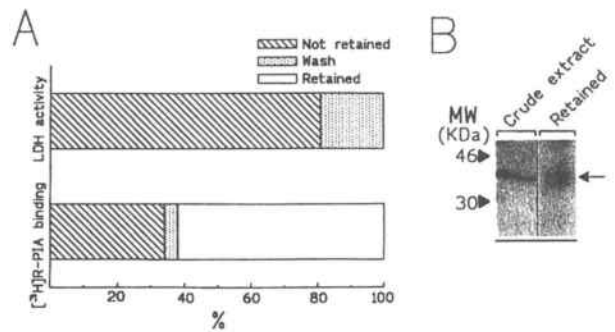
## DISCUSSION

Reportedly, there are several membrane preparations that continuously produce endogenous adenosine (Lin-



**FIG. 5.** Immunoprecipitation of ADA by a specific anti- $A_1$ R antibody. **A:** Pig brain cortical membranes were solubilized in the presence of 2 U/ml of ADA. Solubilized extracts (1 mg of protein/ml) were incubated with the specific anti- $A_1$ R antibodies (PC11 and PC21) or anti-ADA or an irrelevant rabbit anti-mouse IgG. The immunocomplexes were incubated with protein A-Sepharose CL-4B. SDS-PAGE and immunoblotting of the immunoprecipitates were performed to detect the ADA bands with a rabbit anti-ADA antibody. **B:** The same procedure as in A but using either fully active ADA or ADA inhibited by 0.1 mM Hg<sup>2+</sup> or by 0.1 mM deoxycoformycin (DCF; see Materials and Methods). Arrow, ADA; arrowhead, light chain of immunoglobulins.

*J. Neurochem.*, Vol. 66, No. 4, 1996



**FIG. 6.** Chromatography of membrane detergent extracts through an ADA-Sepharose column. **A:** Pig brain detergent-extracts (1 mg of protein/ml) were applied to an ADA-Sepharose column (570 U/ml) as described in Materials and Methods. After the application, the column was exhaustively washed, and all fractions were assayed for  $R$ -[ $^3\text{H}$ ]PIA binding and lactate dehydrogenase (LDH) activity. Data are given as percentages of the total enzyme activity ( $1.66 \mu\text{mol}/\text{min}$ ) or the specific  $R$ -[ $^3\text{H}$ ]PIA binding (4.4 pmol) applied to the column. **B:** Immunoblot after SDS-PAGE of the crude extract and of the retained fraction; the filter was developed using an antibody against  $A_1$ R (PC21). The arrow indicates  $A_1$ R.

den, 1989; Prater et al., 1992). The origin of this adenosine is not known, but it may come from the breakdown of endogenous adenosine nucleotides bound to membranes or trapped in vesicles. For this reason, the experiments of ligand binding to adenosine receptors have always been performed in the presence of ADA. ADA should not be necessary in systems, such as that described here, in which the endogenous adenosine concentration is very low. Thus, the ADA-induced modification of the equilibrium parameters of ligand binding to  $A_1$ R in brain membranes must be due to a catalytic-independent effect of the enzyme on the receptor. Indeed, in this report we have demonstrated, by coprecipitation and affinity chromatography, that ADA interacts with  $A_1$ R from pig brain cortical membranes and that the interaction results in the appearance of the high-affinity form of the receptor. The enzymatic activity of ADA was not involved in the appearance of this high-affinity form, as the same effect was achieved by Hg<sup>2+</sup>-inhibited ADA. Thus, endogenous adenosine in this system does not play any role in the ADA-induced changes of  $A_1$ R equilibrium binding parameters. This may not be a particular case of the pig brain preparation, because we have obtained very similar results working with the smooth muscle cell line DDT<sub>1</sub>MF-2 (manuscript in preparation).

It is interesting to note that, of the two potent inhibitors of the deaminase, Hg<sup>2+</sup> was the only one capable of maintaining the ADA-induced potentiation of ligand binding to  $A_1$ R. *R*-Deoxycoformycin is a transition-state analogue of ADA that alters the conformation of the enzyme. In fact, the x-ray structure of a complex between ADA and the transition state analogue, 6-hydroxyl-1,6-dihydropurine ribonucleoside, indicates that the compound is almost completely inaccessible

to the solvent. Thus, the movement of one or two loops of the enzyme is necessary for allowing access of the analogue to and from the active site (Wilson et al., 1991). On the other hand,  $Hg^{2+}$  probably blocks activity by reacting with some sulfhydryl group, which is essential for enzyme activity but without affecting the conformation of the enzyme. This explanation fits with the results obtained from coprecipitation experiments (Fig. 5B) in which  $Hg^{2+}$  does not affect the interaction between ADA and  $A_1$ Rs, whereas deoxycytosine prevents it. The permanent conformational change induced by the transition-state inhibitor of the enzyme would then result in the disruption of the ADA- $A_1$ R interaction.

An obvious role for ecto-ADA is to degrade extracellular adenosine, thus controlling the amount of nucleoside available to  $A_1$ Rs. The demonstration of measurable effects due to the binding of ecto-ADA to cell surface proteins opens new perspectives in the search for new, catalytic-independent, roles for ecto-ADA. Catania et al. (1991) have demonstrated in cerebellar neurons that ADA, in a catalytic-independent manner, leads to large increases in the influx of  $^{45}Ca^{2+}$  and hydrolysis of polyphosphoinositides.  $A_1$ Rs were not involved because the effect, which might be secondary to a release of excitatory amino acids, was antagonized by glutamate receptor antagonists but not by agonists or antagonists of adenosine receptors. Recently, we have demonstrated that ecto-ADA binding to CD26 produces a costimulatory response in human T cell activation events in a way that is independent of the catalytic activity of ADA (Martín et al., 1995). In this study an interaction between ADA and  $A_1$ Rs is described, and ecto-ADA is able to modulate ligand binding to  $A_1$ Rs in a catalytic independent form. It is suggested that in pig brain cortical membranes the  $A_1$ R acts as an ADA binding protein; however, an ADA/ $A_1$ R interaction mediated by CD26 (also known as dipeptidylpeptidase IV) cannot be ruled out. It is difficult to ascertain whether the interaction described here for the first time accounts for an in vivo phenomenon with physiological relevance. More experiments using in vivo models will be necessary to establish a role for ecto-ADA in the facilitation of signaling events by several different pathways.

**Acknowledgment:** This work was supported by a joint (Echevarne Foundation and Spanish Ministry of Education) PETRI Grant (PTR92/0047) administered by Fundació Bosch i Gimpera and by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (nos. 87/1389 and 91/0272), from DGICYT (PB91/0263), and from CIRIT-DGICYT (QFN93/4423). We thank Robin Rycroft from the Servei d'Assessorament Lingüístic de la Universitat de Barcelona for excellent technical assistance in the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Arán J. M., Canela E. I., and Franco R. (1990) Preparative purification of adenosine deaminase from human erythrocytes by affinity chromatography. *J. Chromatogr.* **532**, 75–85.
- Arán J. M., Colomer D., Matutes E., Vives-Corrons J. L., and Franco R. (1991) Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear cells: immunohistochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001–1008.
- Barnes K., Kenny A. J., and Turner A. J. (1994) Localization of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in pig striatum and in neuronal and glial cell cultures. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 531–537.
- Casadó V., Cantí C., Mallol J., Canela E. I., Lluís C., and Franco R. (1990) Solubilization of  $A_1$  adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* **26**, 461–473.
- Catania M. V., Sortino M. A., Rampello L., Canonico P. L., and Nicoletti F. (1991) Adenosine deaminase increases release of excitatory amino acids through a mechanism independent of adenosine depletion. *Neuropharmacology* **30**, 153–159.
- Ciruela F., Casadó V., Mallol J., Canela E. I., Lluís C., and Franco R. (1995) Immunological identification of  $A_1$  adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* **42**, 818–828.
- Daddona P. E. and Kelley W. N. (1978) Human adenosine deaminase binding protein. Assay, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **253**, 4617–4623.
- Daly J. W. (1977) *Cyclic Nucleotides in the Nervous System*. Plenum, New York.
- Dalziel H. H. and Westfall D. P. (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution and molecular characterization. *Pharmacol. Rev.* **46**, 449–466.
- Fastbom J., Pazos A., and Palacios J. M. (1987a) The distribution of adenosine  $A_1$  receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience* **22**, 813–826.
- Fastbom J., Pazos A., Probst A., and Palacios J. M. (1987b) Adenosine  $A_1$  receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* **22**, 827–839.
- Fleischer B. (1994) CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol. Today* **15**, 180–183.
- Franco R., Canela E. I., and Bozal J. (1986) Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem. Res.* **11**, 423–435.
- Hartelschenk S., Loch N., Zimmermann M., and Reutter W. (1991) Development of monoclonal antibodies against different protein and carbohydrate epitopes of dipeptidyl peptidase IV from rat liver plasma membranes. *Eur. J. Biochem.* **196**, 349–355.
- Hoyer D., Reynolds E. E., and Molinoff P. B. (1984) Agonist-induced changes in the properties of beta-adrenergic receptors on intact 549 lymphoma cells. Time-dependent changes in the affinity of the receptor for agonists. *Mol. Pharmacol.* **25**, 209–218.
- Kameoka J., Tanaka T., Nojima Y., Schlossman S. F., and Morimoto C. (1993) Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen CD26. *Science* **261**, 446–450.
- Kuroda Y. (1978) Physiological roles of adenosine derivatives which are released during neurotransmission in mammalian brain. *J. Physiol. (Lond.)* **74**, 463–470.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Linden J. (1989) Adenosine deaminase for removing adenosine: how much is enough? *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 260–262.
- Lohse M. J., Lenschow V., and Schwabe U. (1984) Two affinity states of  $R_1$  adenosine receptors in brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **26**, 1–9.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Martín M., Huguet J., Centelles J. J., and Franco R. (1995) Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cell triggered by the TCR-CD3 complex: possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J. Immunol.* **155**, 4630–4643.

- Olah M. E. and Stiles G. L. (1992) Adenosine receptors. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 211–225.
- Phillis J. W. and Wu P. H. (1981) The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog. Neurobiol.* **16**, 187–239.
- Prater M. R., Taylor H., Munshi R., and Linden J. (1992) Indirect effect of guanine nucleotides on antagonist binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors: occupation of cryptic binding sites by endogenous vesicular adenosine. *Mol. Pharmacol.* **42**, 765–772.
- Sayós J., Solsona C., Mallol J., Lluís C., and Franco R. (1994) Phosphorylation of adenosine in renal brush-border membrane vesicles by an exchange reaction catalysed by adenosine kinase. *Biochem. J.* **297**, 491–496.
- Schrader W. P., West C. A., Rudofsky U. H., and Samsonoff W. A. (1994) Subcellular distribution of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit kidney: implications for adenosine metabolism. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 775–782.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350–4354.
- Trams E. G. and Lauter C. J. (1975) On the sidedness of plasma-membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 180–197.
- Trotta P. P., Peterfreund R. A., Schonberg R., and Balis M. E. (1979) Rabbit adenosine deaminase conversion proteins. Purification and characterization. *Biochemistry* **18**, 2953–2959.
- Tucker A. L. and Linden J. (1993) Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovasc. Res.* **27**, 62–67.
- Wilson D. K., Rudolph F. B., and Quijcho F. A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* **252**, 1278–1284.

**3. 2. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors.**

Francisco Ciruela, Carles Saura, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís and Rafael Franco.

*FEBS Letters*. **380**, 219-223 (1996).



# Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors

Francisco Ciruela, Carles Saura, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluis, Rafael Franco\*

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí Franquès 1, Barcelona 08028, Catalonia, Spain

Received 30 October 1995; revised version received 2 January 1996

**Abstract** Adenosine deaminase (ADA) is not only a cytosolic enzyme but can be found as an ecto-enzyme. At the plasma membrane, an adenosine deaminase binding protein (CD26, also known as dipeptidylpeptidase IV) has been identified but the functional role of this ADA/CD26 complex is unclear. Here by confocal microscopy, affinity chromatography and coprecipitation experiments we show that  $A_1$  adenosine receptor ( $A_1R$ ) is a second ecto-ADA binding protein. Binding of ADA to  $A_1R$  increased its affinity for the ligand thus suggesting that ADA was needed for an effective coupling between  $A_1R$  and heterotrimeric G proteins. This was confirmed by the fact that ADA, independently of its catalytic behaviour, enhanced the ligand-induced second messenger production via  $A_1R$ . These findings demonstrate that, apart from the cleavage of adenosine, a further role of ecto-adenosine deaminase on the cell surface is to facilitate the signal transduction via  $A_1R$ .

**Key words:** Adenosine receptor; Adenosine deaminase; Protein-protein interaction; Signal transduction; Molecular recognition

## 1. Introduction

Adenosine, acting through specific receptors on the cell surface, is capable of exerting multiple physiological actions in a variety of cell types [1–3]. All known adenosine receptors are heptaspanning macromolecules coupled to heterotrimeric G proteins.  $A_1$  adenosine receptors ( $A_1R$ ) display two different affinity states that depend upon the coupling to heterotrimeric G proteins; coupled receptor-G protein complexes display high affinity ( $K_d = 0.1–0.2$  nM), whereas uncoupled receptors display low affinity ( $K_d = 1–2$  nM) [4–6].

$A_1R$ -mediated signalling depends on the effective concentration of extracellular adenosine, whose regulation involves a variety of nucleoside transport systems and ecto-nucleotidases [7]. Since we discovered adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) on the surface of hematopoietic cells [8], ecto-ADA has also been implicated in controlling the extracellular concentration of the nucleoside. ADA binds to the cell surface of T lymphocytes through the activation marker CD26 [9], which is also known as dipeptidylpeptidase IV or ADA binding protein. In this report, a close interaction between ADA and the  $A_1$  adenosine receptor ( $A_1R$ ) present on DDT<sub>1</sub>MF-2 cells is demonstrated by immunoprecipitation, confocal microscopy and affinity chromatography. Here we also provide evidence that the interaction ADA- $A_1R$  modulates ligand binding to  $A_1R$  and signalling via  $A_1R$ .

\*Corresponding author. Fax: (34) (3) 402 1219.  
E-mail: r.franco@ub.es

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

[<sup>3</sup>H]R-N<sup>6</sup>-(2-phenylisopropyl)-adenosine ([<sup>3</sup>H]R-PIA) (36 Ci/mmol), myo-[<sup>3</sup>H]inositol (85 Ci/mmol) and ECL immunoblotting detection system, were purchased from Amersham (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) was chromatographed through a Sephadex G-100 column and the final preparation was homogenous by electrophoresis. Rabbit anti-ADA antibody (Serotec, Oxford, UK) has been developed in our laboratory [8]. Antibodies against  $A_1$  adenosine receptors, PC11 and PC12, are, respectively, affinity purified (chromatographed through specific peptide coupled to Sepharose) versions of antipeptide antisera PC10 and PC20 developed and characterized as described elsewhere [10]. The specificity of anti- $A_1R$  antibodies was tested as described elsewhere [10]. PC11 and PC21 were not able to recognize ADA from DDT<sub>1</sub>MF-2 cell extracts by immunoblotting (Fig. 3B) and from a calf intestine commercial soluble preparation by immunoprecipitation or immunoblotting. The antibody against CD26 (H12 monoclonal) was purchased from Endogen Inc. DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells from hamster vas deferens were obtained from and cultured as recommended by the American Type Culture Collection.

### 2.2. Enzyme activities and ADA inhibition by Hg<sup>2+</sup>

Adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) and lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.29) activities were estimated as described by Franco et al. [11] (in the presence of 1 μM dipyrindamole and 1 μM nitrobenzylthionosine as adenosine transport inhibitors). Dipeptidylpeptidase IV (CD26, EC 3.4.14.5) activity was assayed as described by Nagatsu et al. [12]. Calf ADA activity (50 U/ml) was completely abolished after preincubation with 100 μM HgCl<sub>2</sub> (2 h) and removal of free Hg<sup>2+</sup> by gel filtration using Sephadex G-25.

### 2.3. Protein determination

Protein was measured as described by Sorensen and Brodbeck [13].

### 2.4. Immunostaining experiments

For confocal microscopy analysis, nonpermeabilized cells were fixed (4% paraformaldehyde) for 15 min and washed in PBS-20 mM glycine. Double immunofluorescence staining was performed after 30 min incubation with PBS-20 mM glycine-1% bovine serum albumin (buffer B) by applying a mixture of antibodies (60 min, 37°C, buffer B): fluorescein-conjugated rabbit anti- $A_1R$  (PC21, 100 μg/ml) and rhodamine-conjugated rabbit anti-ADA (40 μg/ml), or rhodamine-conjugated rabbit anti-ADA (40 μg/ml) and fluorescein-conjugated anti-CD26 (20 μg/ml), or rhodamine-conjugated PC21 (100 μg/ml) and fluorescein-conjugated anti-CD26 (20 μg/ml). Rinsed coverslips were mounted with immunofluorescence medium. Observations were performed with a Leica TCS 4D confocal scanning laser microscope.

Immunoprecipitation of  $A_1R$  cross-linked to iodinated (R)-2-azido-N<sup>2</sup>-p-hydroxy-PIA(R-AHPA), autoradiography and immunoblotting were performed as described by Ciruela et al. [10].

### 2.5. Radioligand binding assay

Saturation analysis of [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to membranes (0.7 mg/ml) was performed as previously described [14]. Experiments using intact cells (1.5 million/ml) were performed at 4°C for 4 h in serum-free DMEM buffered with 20 mM HEPES, pH 7.4. Saturation isotherms were obtained from five replicates for each [<sup>3</sup>H]R-PIA concentration (8 in the range 0.01–200 nM) and were fitted by non-linear regression analysis. The *F*-test was used to discriminate between two affinity states

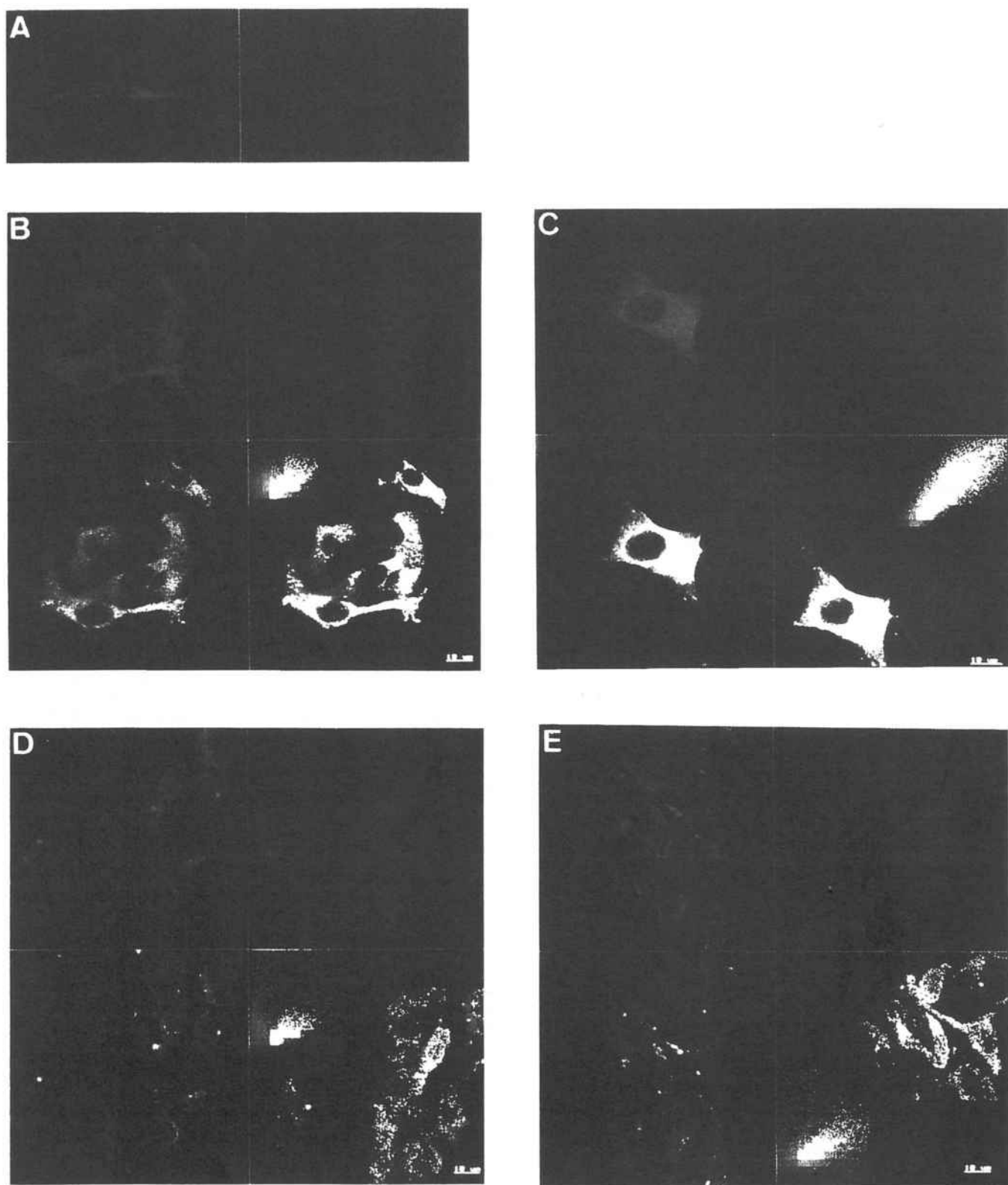


Fig. 1. Distribution of  $A_1R$ , ADA and CD26 on the  $DDT_1MF-2$  cell surface. Nonpermeabilized cells were fixed (4% paraformaldehyde) for 15 min and washed in PBS-20 mM glycine. Double immunofluorescence staining was performed as indicated in section 2. Panel A. Vertical section of cells labeled for  $A_1R$  (left) and ADA (right). Images are at the same scale than in panel B. Panel B. Surface expression of  $A_1R$  (upper left) and ADA (upper right). Panel C. Cell on glass coverslips were preincubated with 2 U/ml of exogenous ADA (30 min) before fixation (ADA from Sigma was chromatographed on Sephadex G-100; the final preparation was homogenous by electrophoresis). Surface expression of  $A_1R$  (upper left) and ADA (upper right). Panel D. Surface expression of CD26 (upper left) and ADA (upper right). Panel E. Surface expression of CD26 (upper left) and  $A_1R$  (upper right). In B, C, D and E, the lower left image corresponds to the superposition of the two fluorescences (yellow) whereas the bottom right image shows colocalization in white (insert: multi-color analysis of confocal images). Scale bar = 10  $\mu m$ .

and one affinity state. The two-site model was selected when  $P < 0.001$  [14].

### 2.6. Chromatography of $A_1$ adenosine receptor using an ADA affinity column

Solubilized extracts (2 mg protein/ml, 0.5% CHAPS, 0.5% digitonin in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4) obtained from DDT<sub>1</sub>MF-2 cells were applied to a 1 ml of ADA-affinity column at a flow rate of 2.5 ml/h at room temperature. The ADA-affinity column was prepared by direct coupling of 10 mg of commercial calf intestinal adenosine deaminase (filtered through Sephadex G-25 and further purified to homogeneity by affinity chromatography) to a 1 g of cyanogen bromide-activated Sepharose. After the application, the column was cooled to 4°C and washed with 15 volumes of 50 mM Tris-HCl, 0.1% CHAPS, 0.1% digitonin, pH 7.4, until no protein was detected in the eluates. All fractions were assayed for [<sup>3</sup>H]R-PIA binding, lactate dehydrogenase activity and protein.

### 2.7. Second messengers determination

Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores and the level of inositol phosphates (InsP) were measured as described elsewhere [15–17]. In cells (10<sup>6</sup> cells/ml) loaded with the fluorescent dye Fura 2-AM (5 μM, 30 min), the 50 nM R-PIA-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization, was determined in a dual-wavelength fluorimeter by using the ratio of excitation wavelengths 334/366 nm with emission cut off at 500 nm. For inositol phosphates determination, inositol-starved cells (0.5 million/ml) were incubated with DMEM containing myo[<sup>3</sup>H]inositol (5 μCi/ml) for 40–48 h. After addition of 10 mM LiCl (10 min), inositol phosphate production was induced (15 min) by 50 nM R-PIA. Cells were treated with perchloric acid and total [<sup>3</sup>H]InsP was isolated using a Dowex AG1-X8 column.

## 3. Results and discussion

DDT<sub>1</sub>MF-2 cells exhibit ecto-ADA. When 60 μM adenosine was used as substrate, ecto-ADA activity (see section 2) was 1.0 mU per million of intact cells. DDT<sub>1</sub>MF-2 cells also express on their surface binding sites for the  $A_1$  adenosine receptor specific agonist [<sup>3</sup>H]R-PIA (see Table 1). These cells therefore provide a unique model to study potential interactions between the receptor for a ligand (adenosine) and the ecto-enzyme responsi-

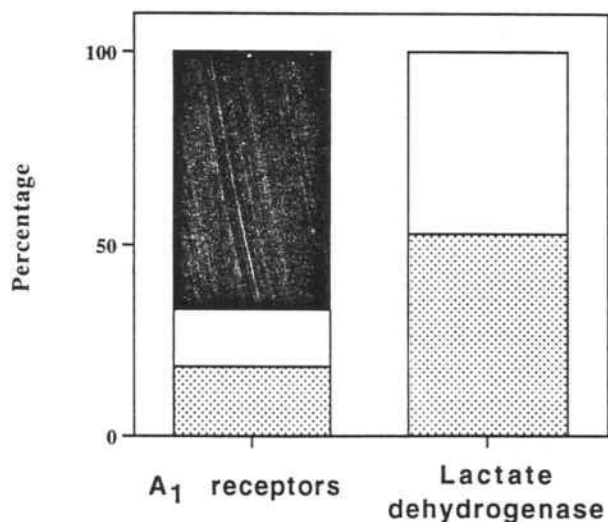


Fig. 2. Chromatography of cell extracts through an ADA-Sepharose column. The 1 nM [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to  $A_1$  adenosine receptors and the lactate dehydrogenase activity was determined in the different fractions: not retained (dotted), wash (white) and retained (black). Values are given in percentage respect to the total amount applied: 4 pmol for  $A_1$  adenosine receptors and 0.36 μmol/min for lactate dehydrogenase activity.

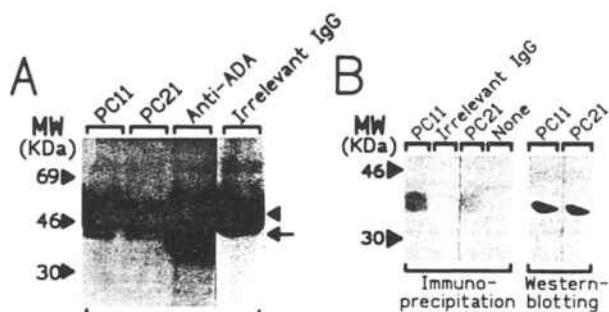


Fig. 3. Immunoblotting of  $A_1$ R and ADA. Panel A. Coprecipitation of ADA using antibodies against  $A_1$ R. DDT<sub>1</sub>MF-2 cell membranes were solubilized using 1% Nonidet-P40; immunoprecipitation using PC11 and PC12 (or anti-ADA and irrelevant IgG as controls) (40 μg/ml of each antibody) and immunoblotting (PVDF membranes) were performed as indicated in section 2. PVDF membranes were treated with anti-ADA antibody (5 μg/ml) and immunoreactive bands were visualized by horseradish-peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG antibodies (1:15000-fold dilution), followed by ECL chemiluminescence detection. Arrow: ADA Arrow head: IgG heavy chain. Panel B.  $A_1$ R recognition by PC11 and PC21. Immunoprecipitation of  $A_1$ R cross-linked to iodinated (*R*)-2-azido-*N*2-*p*-hydroxy-PIA (R-AHPIA) (left image). Labelled membranes (0.5 mg protein/ml) were immunoprecipitated in the absence or in the presence of 40 μg/ml of either PC11, PC21 or an irrelevant IgG. Immunoprecipitated material was analyzed by SDS-PAGE. The gel was run, dried and autoradiographed. Immunoblotting of  $A_1$ R using PC 11 and PC21 antibodies (right image). In DDT<sub>1</sub>MF-2 cells the 74 kDa band that PC21 recognizes in pig brain membranes [10], was not detected.

ble for ligand degradation. As judged by cell surface immunofluorescence staining with rhodamine isothiocyanate-conjugated anti-ADA and fluorescein isothiocyanate-conjugated anti- $A_1$ R, the cell surface distributions of ADA (red fluorescence) and  $A_1$ R (green fluorescence) on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells appeared similar (Fig. 1A,B). The label was indeed corresponding to a cell surface staining as judged by the lack of intracellular stain (Fig. 1A). Further analysis by confocal microscopy demonstrated that the degree of colocalization between ADA and  $A_1$ R on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells was very high. The intensity of white and its situation far from the axis origin of the cytofluorogram indicated that the colocalization was quantitatively very high (Fig. 1B, insert of the bottom right image). Since DDT<sub>1</sub>MF-2 cells also express CD26 on their surface (dipeptidylpeptidase activity using 1 mM gly-pro-paranitroanilide as substrate was 3.4 mU per million cells), the codistribution of ADA (red fluorescence) and CD26 (green fluorescence) (Fig. 1D) and of CD26 (green fluorescence) and  $A_1$ R (red fluorescence) (Fig. 1E) were studied. In contrast to the codistribution of ADA and  $A_1$ R, ADA and CD26 or  $A_1$ R and CD26 had a different distribution pattern with a moderate degree of colocalization (in white). Taken together, these colocalization studies suggested that there were significantly more ADA molecules colocalizing with  $A_1$ R than with CD26; therefore,  $A_1$ R may act as a second receptor for ecto-ADA.

Next we examined whether exogenous ADA could bind to cell surface  $A_1$ R molecules that did not colocalize with endogenous ADA, i.e. those labelled green in the images of Fig. 1B. Indeed, addition of exogenous ADA led to the complete disappearance of the green fluorescence and to an increase in white in the confocal images, which indicated increased colocalization (Fig. 1C). Thus, all  $A_1$ R molecules present on the sur-

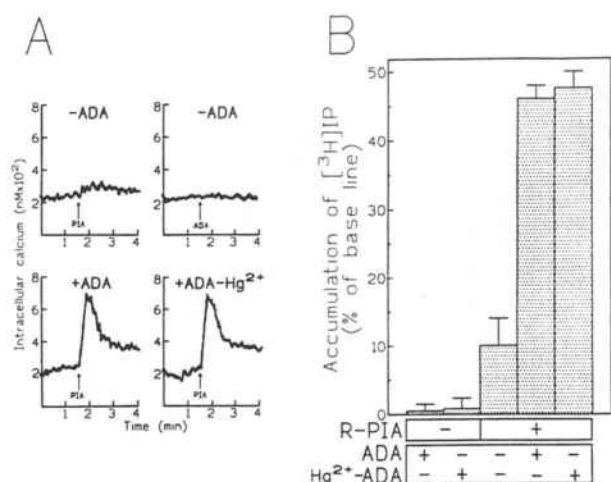


Fig. 4. R-PIA-induced calcium mobilization and total [<sup>3</sup>H]InsP production in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. 50 nM R-PIA induced calcium mobilization (A) and inositol phosphates production (15 min) (B). Cells were incubated (30 min) in the absence (-ADA) or presence of 0.2 U/ml of adenosine deaminase, enzymatically active (+ADA) or irreversibly inhibited by 100 μM HgCl<sub>2</sub> (2 h, room temperature) and desalted through a Sephadex G-25 (+ADA-Hg<sup>2+</sup>).

face of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells can bind ADA. We conclude that an interaction ADA-A<sub>1</sub>R occurs at the cell surface level in intact cells.

The ability of ADA to recognize A<sub>1</sub>R was confirmed by isolating the A<sub>1</sub>R from a detergent extract (obtained as described in section 2) with an ADA-Sepharose affinity column. A<sub>1</sub>R was 67% retained within the column whereas a control protein, lactate dehydrogenase, was completely eluted (Fig. 2). Conversely, ADA was coprecipitated from membrane extracts

using two (PC11 and PC21) different anti-peptide anti-A<sub>1</sub>R antibodies (Fig. 3A). Both antibodies immunoprecipitated A<sub>1</sub>R photolabelled with [<sup>125</sup>I]R-PIA (with an efficiency that ranges from 15 to 25% [10]) and both recognized the 39 kDa band of the receptor by Western blotting (Fig. 3B). However, PC11 was more effective in immunoprecipitation and Western blotting experiments than PC21. For this reason the coprecipitated ADA band was stronger when PC11 was used (Fig. 3A). These results support the notion that A<sub>1</sub>R binds ADA on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells.

Because ADA and A<sub>1</sub>R interacted on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells, the influence of ADA on the thermodynamic behavior of the agonist [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to A<sub>1</sub>R was analyzed. Addition of ADA reportedly results in an increase in [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to A<sub>1</sub>R as a consequence of the degradation of endogenous adenosine [18,19]. The effect of exogenous ADA on [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to intact DDT<sub>1</sub>MF-2 cells and to membranes from these cells was analyzed. A<sub>1</sub>R in intact cells displayed, in the absence of external ADA, a very low affinity state ( $K_d = 40$  nM) similar to that found in membrane preparations (Table 1). In the presence of exogenous ADA the affinity for [<sup>3</sup>H]R-PIA increased significantly ( $K_d = 10$  nM). The effect of ADA in membranes was more pronounced since it converted the single very-low affinity state of A<sub>1</sub>R ( $K_d = 50$  nM) into two states (one of high affinity, 0.79 nM, and another of low affinity, 8.7 nM). The complete blockade of deaminase activity, by preincubating ADA with Hg<sup>2+</sup>, did not produce any significant changes in the  $K_d$  and  $B_{max}$  values obtained in the presence of ADA (Table 1). On the other hand, endogenous adenosine did not affect [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to A<sub>1</sub>R. First, the concentration of adenosine in the binding assays to membranes was very low (25–40 nM detected by HPLC). Second, IC<sub>50</sub> values for adenosine as displacer of [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to membranes in presence of Hg<sup>2+</sup>-inhibited ADA were very high: 129 μM (high-

Table 1  
Equilibrium parameters of [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to DDT<sub>1</sub>MF-2 cells and to cell membranes in the absence or presence of ADA

	Presence of ADA	Affinity-state	$K_d$ (nM)	$B_{max}$ (pmol/mg prot.)
Membranes	None	High-affinity	–	–
		Low-affinity	–	–
		Very low-affinity	50 ± 10	0.4 ± 0.1
	0.2 U/ml	High-affinity	0.79 ± 0.09	0.28 ± 0.03
		Low-affinity	8.7 ± 1.6	0.15 ± 0.05
		Very low-affinity	–	–
	*0.2 U/ml plus Hg <sup>2+</sup>	High-affinity	1.5 ± 0.5	0.25 ± 0.05
		Low-affinity	9 ± 2	0.13 ± 0.07
		Very low-affinity	–	–
Intact cells	None	High-affinity	–	–
		Low-affinity	–	–
		Very low-affinity	40 ± 10	0.10 ± 0.03
	0.2 U/ml	High-affinity	–	–
		Low-affinity	10 ± 6	0.11 ± 0.02
		Very low-affinity	–	–
	*0.2 U/ml plus Hg <sup>2+</sup>	High-affinity	–	–
		Low-affinity	10 ± 3	0.15 ± 0.02
		Very low-affinity	–	–

\*ADA in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, was incubated for 2 h with 100 μM HgCl<sub>2</sub>. Free Hg<sup>2+</sup> was eliminated by gel filtration using Sephadex G-25. The eluted protein (Hg<sup>2+</sup>-ADA) was devoid of deaminase activity.

affinity) and 2.7 mM (low-affinity). Thus, this alteration in the behavior of membrane A<sub>1</sub>R in the presence of ADA is not due to the degradation of the endogenous ligand, adenosine, but to a direct effect upon A<sub>1</sub>R.

Does ADA induce signal transduction events via A<sub>1</sub>R? To address this, DDT<sub>1</sub>MF-2 cells were treated with R-PIA with or without ADA (or Hg<sup>2+</sup>-inhibited ADA) and the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores and the level of inositol phosphates (InsP) were measured. As shown in Fig. 4A, the R-PIA-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> in the presence of exogenous ADA was five-fold higher than in the absence of the enzyme. ADA by itself did not modify the level of these second messengers. In some experiments the effect of R-PIA upon Ca<sup>2+</sup> mobilization was evident only in the presence of exogenous ADA. The increase in inositol phosphates was also amplified by external ADA (Fig. 4B). Induction of both second messengers was independent of the catalytic activity of the enzyme since a similar potentiation was obtained by Hg<sup>2+</sup>-inhibited ADA. Thus, ADA is necessary for an efficient coupling of A<sub>1</sub>R with the signal transduction machinery. Signalling in the absence of ADA may be due to a small proportion of A<sub>1</sub>R molecules interacting with endogenous ADA. It should be noted that signalling via A<sub>1</sub> adenosine receptors has been always investigated in the presence of exogenous ADA. This practice used in principle to eliminate the endogenous ligand, adenosine, has led to believe that exogenous ADA had no effect on ligand-induced signalling. However, as evidenced here, ecto-ADA has a key role in A<sub>1</sub>R functioning.

Taking into account that the changes of affinity in the case of A<sub>1</sub>R reportedly reflect changes in the coupling to heterotrimeric G proteins, we postulate that ADA is required for coupling of the A<sub>1</sub>R to heterotrimeric G proteins in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. This is the first report providing evidence that a heptaspanning receptor requires a cell surface protein for efficient signalling. Modulation of A<sub>1</sub>R-mediated signal transduction by ADA-A<sub>1</sub>R interaction opens a new perspective in the regulation mechanism of heptaspanning receptors coupled to G proteins.

*Acknowledgements:* Supported by a joint (Echevarne Foundation and Spanish Ministry of Education) PETRI Grant (PTR92/0047) and by Grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (no. 87/1389 and 91/0272), from CICYT (PB94/0941) and from CIRIT-CICYT (QFN93/4423).

## References

- [1] Olah, M.E. and Stiles, G.L. (1992) *Annu. Rev. Physiol.* 54, 211–225.
- [2] Tucker, A.L. and Linden, J. (1993) *Cardiovascular Res.* 27, 62–67.
- [3] Dalziel, H.H. and Westfall, D.P. (1994) *Pharmacol. Rev.* 46, 449–466.
- [4] Lohse, M.J., Lenschow, V. and Schwabe, U. (1984) *Mol. Pharmacol.* 26, 1–9.
- [5] Klotz, K.N., Lohse, M.J. and Schwabe, U. (1986) *J. Neurochem.* 46, 1528–1534.
- [6] Casadó, V., Allende, G., Mallol, J., Franco, R., Lluís, C. and Canela, E.I. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 1463–1474.
- [7] Kwong, F.Y.P., Fincham, H.E., Davies, A., Beaumont, N., Henderson, P.J.F., Young, J.D. and Baldwin, S.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21954–21960.
- [8] Arán, J.M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, J.L. and Franco, R. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* 39, 1001–1008.
- [9] Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S.F. and Morimoto, C. (1993) *Science* 261, 466–469.
- [10] Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1996) *J. Neurosci. Res.*, in press.
- [11] Franco, R., Canela, E.I. and Bozal, J. (1986) *Neurochem. Res.* 11, 423–435.
- [12] Nagatsu, T., Hino, M., Fuyamada, H., Hayakawa, T., Sakakibara, S., Nakagawa, Y. and Takemoto, T. (1976) *Anal. Biochem.* 74, 466–476.
- [13] Sorensen, K. and Brodbeck, U. (1986) *Experientia* 42, 161–162.
- [14] Casadó, V., Cantí, C., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1990) *J. Neurosci. Res.* 26, 461–473.
- [15] Gerwins, P. and Fredholm, B.B. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 16081–16087.
- [16] White, T.E., Dickenson, J.M., Alexander, S.P.H. and Hill, S.J. (1992) *Br. J. Pharmacol.* 106, 215–221.
- [17] Dickenson, J.M. and Hill, S.J. (1993) *Br. J. Pharmacol.* 108, 85–C92.
- [18] Linden, J. (1989) *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 260–262.
- [19] Prater, M.R., Taylor, H., Munshi, R. and Linden, J. (1992) *Mol. Pharmacol.* 42, 765–772.

### **3.3. Ligand-induced phosphorylation, clustering, and desensitization of A<sub>1</sub> adenosine receptors.**

Francisco Ciruela\*, Carles Saura\*, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís and Rafael Franco.

*Molecular Pharmacology*. **52**, 788-797 (1997).

\* Idéntica contribución en este trabajo

## Ligand-Induced Phosphorylation, Clustering, and Desensitization of A<sub>1</sub> Adenosine Receptors

FRANCISCO CIRUELA,<sup>1</sup> CARLES SAURA, ENRIC I. CANELA, JOSEFA MALLOL, CARMEN LLUÍS, and RAFAEL FRANCO

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalunya, Spain*

Received February 18, 1997; Accepted July 23, 1997

### SUMMARY

Through immunocytochemistry with the use of antibodies against A<sub>1</sub> adenosine receptors (A<sub>1</sub>Rs) and confocal microscopy, we show that stimulation of A<sub>1</sub>Rs by the agonist (*R*)-phenylisopropyladenosine [(*R*)-PIA] caused a rapid (5–15 min) aggregation (clustering) of receptor molecules on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. Internalization of the chronically stimulated receptor was slower and occurred concomitantly, with a time-dependent decrease (50%) in the number of cell surface [<sup>3</sup>H](*R*)-PIA binding sites. The reduction of binding sites was due partly (30%) to internalization and partly (20%) to the presence of desensitized cell surface receptor molecules that were unable to bind the ligand. Chronic exposure of DDT<sub>1</sub>MF-2

cells to 50 nM (*R*)-PIA produced functional desensitization, as deduced from second messenger production assays. Quantification of the content of A<sub>1</sub>Rs by immunoblotting and flow cytometry in cells pretreated with 50 nM (*R*)-PIA indicates a time-dependent slow down-regulation of the receptor. Receptor clustering and agonist-induced receptor phosphorylation, which occurred in serine and tyrosine, were simultaneous. The finding that activators of protein kinase A or C were able to induce functional desensitization of A<sub>1</sub>Rs, phosphorylate A<sub>1</sub>Rs in serine and threonine, and trigger clustering of the receptor suggests that phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs in serine/threonine is involved in desensitization-related events.

The ubiquitous nucleoside adenosine exerts multiple physiological actions via specific receptors, four of which (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, and A<sub>3</sub>) have been cloned (see Ref. 1 for a review). A<sub>1</sub>Rs are functionally coupled to members of the pertussis toxin-sensitive family of G proteins, G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, G<sub>i3</sub>, and G<sub>o</sub> (2, 3). Activation of A<sub>1</sub>Rs regulates several membrane and intracellular proteins, such as adenylate cyclase, Ca<sup>2+</sup> channels, K<sup>+</sup> channels, and phospholipase C (see Ref. 1 for a review). The smooth muscle cell line DDT<sub>1</sub>MF-2 from hamster vas deferens expresses the A<sub>1</sub>Rs in a stable manner (4). Equilibrium parameters for agonist binding to these cells are similar to those found in intact tissue preparations. On the other hand, the number of receptors for each cell is high ( $B_{max} = 0.16$  pmol/mg of protein, which represents ~100,000 receptors/cell). These cells are thus more suitable than transfected cells for the study of A<sub>1</sub>R function. In fact, overexpression of protein molecules in transfected cells may lead to artifactual

results in experiments designed to elucidate receptor physiology.

Chronic agonist stimulation of certain receptors induces desensitization (an attenuated response to stimulation) and down-regulation (internalization and reduction in the number of receptor molecules per cell). Among G protein-coupled receptors, desensitization and down-regulation have been extensively studied in cell systems expressing  $\beta$ -adrenergic receptors (see Ref. 5 for a review). On the basis of these studies, it has been suggested that after a short period of agonist exposure, the receptors uncouple from G proteins due to phosphorylation catalyzed by receptor-specific kinases (e.g.,  $\beta$ -adrenoceptor-associated receptor kinase-1 and -2) and/or kinases regulated by second messengers (e.g., PKA). Phosphorylation of the receptor by specific kinases increases the affinity of the receptor for cytosolic factors (arrestins), whereas phosphorylation by PKA impairs the ability of the receptor to interact with G proteins (6–8). Receptor internalization or sequestration are phenomena by which a receptor translocates to intracellular compartments. Ligand-induced sequestration has been described for  $\beta_2$ -adrenergic receptors in several cell lines, but the molecular mechanisms are not fully understood (9–12). Internalization is usually incom-

This work was supported by CICYT Grants PB91/0263 and PB94/0941 and CIRIT-CICYT Grant QFN93/4423. F.C. and C.S. contributed equally to this work.

<sup>1</sup> Current affiliation: MRC Anatomical Neuropharmacology Unit, University of Oxford, Oxford OX1 3TH, UK.

**ABBREVIATIONS:** A<sub>1</sub>R, A<sub>1</sub> adenosine receptor; ADA, adenosine deaminase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; HBSS, Hanks' balanced salt solution; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, phosphate-buffered saline; CHO, Chinese hamster ovary; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; AM, acetoxymethyl ester; (*R*)-PIA, (*R*)-phenylisopropyladenosine; DPCPX, 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; Cl $\phi$ , chlorophenyl; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

plete, and it alters the resensitization process, as occurs in the case of muscarinic receptors (13, 14). However, through the use of immunocytochemical techniques, Smit *et al.* (15) demonstrated that immunoreactivity against histamine H<sub>2</sub> receptors tagged at the amino terminus completely disappears after 1 hr of agonist treatment. The authors also show that histamine causes internalization of the receptor in stably transfected human embryonic kidney 293 by a cAMP-independent pathway. Furthermore, Berry *et al.* (16) demonstrated a rapid and almost complete agonist-induced internalization of 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor via the endosome pathway.

Desensitization of adenosine receptors has been characterized by pharmacological and molecular approaches in a variety of model systems (10, 17–21). Desensitization and down-regulation of A<sub>1</sub>Rs and A<sub>2a</sub> adenosine receptors in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells follow two distinct pathways (22). Pretreatment of cells with high doses of agonist results in a rapid loss of agonist stimulation of adenylate cyclase activity with no change in receptor number or affinity for the ligand. In contrast, desensitization of A<sub>1</sub>Rs follows a decrease in the number of receptors in membrane preparations and seems to be mediated by receptor phosphorylation (22). Further characterization of desensitization mechanisms of canine A<sub>2a</sub> adenosine receptors indicates that agonist-stimulated receptor phosphorylation may induce short term desensitization by impairing receptor/G<sub>s</sub> coupling. In addition, long term desensitization is mediated by down-regulation of the receptor and up-regulation of inhibitory G proteins (17). In this report, the distribution of A<sub>1</sub>Rs in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells was studied by immunocytochemistry using two antipeptide antibodies against A<sub>1</sub>Rs. Desensitization mechanisms of A<sub>1</sub>Rs have been analyzed using a set of techniques that include confocal microscopy, ligand binding, and immunoblotting. The results provide direct evidence of agonist-induced cell surface A<sub>1</sub>R aggregation and subsequent receptor desensitization and internalization. Moreover, the level of phosphorylation of the receptor, in serine, threonine, or tyrosine, has been analyzed in cells treated chronically with the agonist.

## Experimental Procedures

**Materials.** [<sup>3</sup>H](R)-PIA (36Ci/mmol), *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol (85 Ci/mmol), and the enhanced chemiluminescence immunoblotting detection system were purchased from Amersham (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). [<sup>32</sup>P]Orthophosphate was from New England Nuclear Research Products (Boston, MA). DPCPX was from Research Biochemicals (Natick, MA). (R)-PIA, phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, leupeptin, chymostatin, antipain, fluorescein isothiocyanate, rhodamine isothiocyanate, PMA, Cl<sub>2</sub>-cAMP, and Fura-2 AM were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Calf adenosine deaminase, which was filtered through Sephadex G-25 before all assays, and electrophoresis reagents were obtained from Boehringer-Mannheim (Barcelona, Spain). Sephadex G-25 fine grade and Protein A-Sepharose CL4B were from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). All other products were of the best grade available and purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Deionized water further purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA) was used throughout the study.

**Antibodies.** Antipeptide antisera against A<sub>1</sub>Rs were generated by immunization of female New Zealand White rabbits with the use of Bio-Kit (Barcelona, Spain) and characterized as described previously (23). The peptides used for immunization correspond to a 19-amino acid sequence of the third intracellular loop of A<sub>1</sub>Rs (PC11

antibody) and a 14-amino acid sequence of the second extracellular loop of A<sub>1</sub>Rs (PC21 antibody). The antiserum generated was purified by affinity chromatography using the specific peptide coupled to Sepharose CL4B. Sheep anti-rabbit IgG-fluorescein F(ab')<sub>2</sub> fragment and horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG were purchased from Boehringer-Mannheim. Purified anti-phosphoserine (clone 1C8 plus 4A3) and anti-phospho-threonine (clone 1E11) monoclonal antibodies were purchased from BIOMOL (Hamburg, Germany), and anti-phospho-tyrosine monoclonal antibody (clone PT-66) was from Sigma Chemical.

**Cell cultures, membrane preparation, and protein determination.** DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells, originally isolated from a steroid-induced leiomyosarcoma of Syrian hamster vas deferens (4), were cultured (37° in 5% CO<sub>2</sub>) in DMEM. CACO-2 cells, an epithelial cell line derived from human colon carcinoma, were cultured in DMEM. CHO cells were cultured in DMEM/Ham's F-12 nutrient mixture (1:1 v/v) medium, and Jurkat cells, derived from human T leukemia, were grown in RPMI 1640 medium (all media were from Whittaker, Walkersville, NY). Media were supplemented with 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 10% (v/v) fetal calf serum (CACO-2, CHO, and Jurkat cells) or 5% (v/v) fetal calf serum and 5% (v/v) horse serum (DDT<sub>1</sub>MF-2 cells). All sera were from GIBCO (Grand Island, NY). For desensitization and sequestration experiments, DDT<sub>1</sub>MF-2 cells were grown in the absence or presence of 50 nM (R)-PIA and/or 50 nM DPCPX, 50 μM Cl<sub>2</sub>-cAMP, or 10 nM PMA. After the indicated incubation time, cells were washed in cold PBS; then, binding experiments, immunoblotting, determination of [<sup>3</sup>H]inositol phosphate accumulation, intracellular calcium determination, and/or immunocytochemistry assays were performed.

Cell membranes from DDT<sub>1</sub>MF-2, CHO, CACO-2, and Jurkat cells were obtained by centrifugation after disruption of cells with a Polytron homogenizer (Kinematica, PTA 20 TS rotor, setting 4; Brinkmann Instruments, Westbury, NY) for three 5-sec periods. The buffer used was 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Nuclei and cell debris were separated by centrifugation (900 × g, 4°). Membranes were then separated at 105,000 × g (90 min, 4°). The pellet was resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer for immediate use.

Protein was measured by the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical, Rockford, IL), as described by Sorensen and Brodbeck (24).

**Radioligand-binding experiments and analysis of binding data.** For agonist binding to intact cells, cells pretreated as indicated above were harvested and resuspended (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) in assay medium (serum-free DMEM buffered with 20 mM HEPES, pH 7.4). Cells were preincubated with 0.2 units/ml ADA for 30 min at 4°. Aliquots (0.1 ml) were then added to 96-well microtiter plates containing [<sup>3</sup>H](R)-PIA (eight concentrations of 0.01–200 nM; experiments performed in triplicate) in a final volume of 0.2 ml. Nonspecific binding was defined as that occurring in the presence of a 500-fold excess of DPCPX. Binding was carried out at 4° for 4 hr. In the case of membranes, suspensions were incubated with 0.2 unit/ml adenosine deaminase (30 min, 25°) before the addition of the radioligand (12 nM final concentration). Binding, performed in 96-well microtiter plates, was carried out at 20° for 2.5 hr. Binding was stopped by a rapid filtration over glass-fiber filters (GF/C filters; Whatman, Maidstone, UK) in a Brandel cell harvester (Brandel Biomedical Research and Development Laboratories, MD). Filters were then washed in 5 ml of ice-cold PBS (cells) or Tris-HCl buffer (membranes). Filters were transferred to scintillation vials, and 10 ml of scintillation fluid (Formula-989; New England Nuclear Research Products) was added. Vials were shaken overnight and counted using a Packard 1600 TRI-CARB scintillation counter with 50% of efficiency.

Data from saturation isotherms were analyzed by nonlinear regression as described previously (25).

**Second messenger determination.** For intracellular calcium measurement, cells (10<sup>6</sup> cells/ml) were loaded with 5 μM Fura-2 AM for 30 min at 37°. For short term desensitization, loaded cells were



washed and incubated (5 min, 37°) in HBSS (1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.4) containing the indicated reagents [50 nM (R)-PIA, 50 μM Cl $\phi$ -cAMP, or 10 nM PMA]. It should be noted that for long term desensitization, reagents [50 nM (R)-PIA or 50 nM DPCPX] were incubated for 48 hr before the loading step. In all cases, cells were washed and subsequently incubated in HBSS containing 0.2 unit/ml ADA. Calcium peak induction was achieved by the addition of (R)-PIA. (R)-PIA concentration was 50 nM for short term desensitization and 1 nM to 10 μM for long term desensitization. Calcium concentration was determined at 30° in a dual-wavelength Shimadzu RF-5000 spectrofluorophotometer (Shimadzu Europe, Duisberg, Germany) by using the excitation wavelength ratio of 334/366 nm with emission cutoff at 500 nm. Free calcium concentration was calculated as described previously (26).

For the phosphoinositide assay, cells (0.5–1 × 10<sup>6</sup>/ml) were grown (40–48 hr) in inositol-free medium (DMEM supplemented with 5% horse serum and 5% fetal calf serum, both dialyzed against inositol-free DMEM) containing *myo*-[<sup>3</sup>H]inositol (5 μCi/ml). Washed cells, subsequently incubated with the indicated reagents, were collected; washed exhaustively in prewarmed (37°) PBS containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; and incubated (10<sup>6</sup>/0.2 ml of PBS) in PBS containing 10 mM LiCl and 0.2 unit/ml ADA for 10 min. The phosphoinositide production was initiated by the addition of 0.1 ml of prewarmed PBS containing (R)-PIA (concentration, 50 nM for short term desensitization and 1 nM to 10 μM for long term desensitization). After 30 min, the assay was ended by perchloric acid protein precipitation (30 min on ice). Neutralized samples (4 M KOH, 1 M Tris, 60 mM EDTA) were centrifuged for 20 min at 3000 × *g*, and the aqueous phase was loaded into a Poly-Prep chromatography column (BioRad, Sweden) containing 1 g of an anion exchange resin (AG 1-Xi; 200–400 mesh; formate form). The total inositol phosphate pool was eluted according to the method of Berridge *et al.* (27), and the radioactivity was measured.

**Immunostaining experiments.** For flow cytometry measurements, pretreated cells were harvested, rinsed in PBS, and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min or fixed and permeabilized (4°, 1 hr) in 70% ethanol/30% PBS. Cells were washed in PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. After a 30-min incubation in buffer A containing 1% bovine serum albumin (buffer B), cells were incubated first with anti-A<sub>1</sub>Rs (PC21 or PC11; 40 μg/ml) for 1 hr at 37°, washed, and stained with fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG antibody. As control, an irrelevant rabbit IgG was used. Stained cells were analyzed with an EPICS Profile flow cytometer (Coulter, Hialeah, FL). Mean fluorescence from 5000 cells was measured, and the mean value of triplicate experiments was presented as percentage of control cells.

For immunofluorescence staining, cells growing onto glass coverslips were incubated in the absence or presence of 50 nM (R)-PIA, 50 μM Cl $\phi$ -cAMP, or 10 nM PMA in complete medium for 5, 15, or 45 min. They were then rinsed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min, and washed in buffer A. After a 30-min incubation with buffer B, immunofluorescence staining was performed by applying a fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>Rs (PC21 antibody; 100 μg/ml, 60 min at 37°). The coverslips were rinsed for 30 min in buffer B and mounted with immunofluorescence medium (ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA).

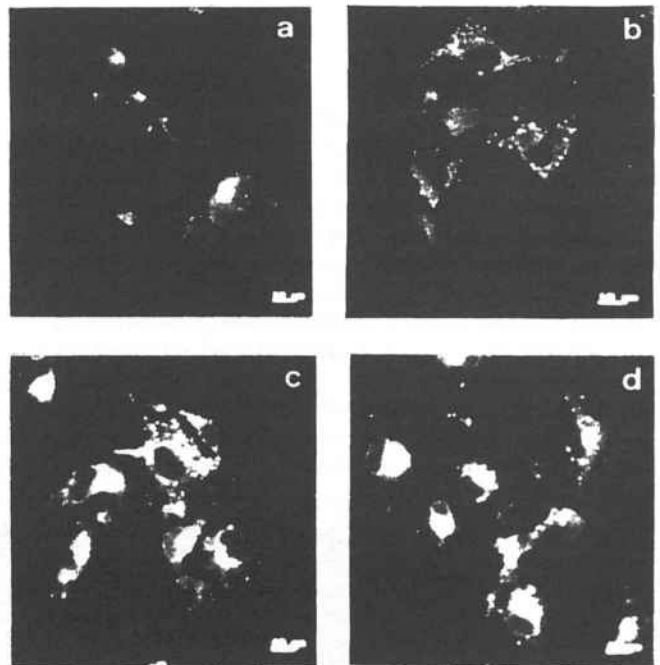
To analyze receptor internalization by immunocytochemistry, cells growing onto glass coverslips in the presence of a fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>Rs (PC21 antibody; 5 μg/ml), were incubated with or without 50 nM (R)-PIA and 50 μM Cl $\phi$ -cAMP or 10 nM PMA in a complete medium for 5, 12, 24, 48, and 72 hr and then rinsed in PBS. At this step, it is important to note that fluorescein-conjugated PC21, which was interacting with membrane receptor in nonfixed cells, was washed up, and only internalized fluorescein-conjugated PC21 remained in the preparation. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and washed twice in PBS containing 20 mM glycine. The coverslips were mounted as described

above. The efficiency of the labeling for cells grown in the presence of fluorescein-conjugated PC21 and fixed afterward is lesser than that for cells fixed and then treated with fluorescein-conjugated PC21 (compare Figs. 1 and 3).

Confocal microscope observations were made with a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg, Germany) confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope.

**Phosphorylation, autoradiography, and immunoblotting.** Cells (50 × 10<sup>6</sup>), harvested and washed twice in phosphate-free DMEM, were incubated at 37° for 2 hr with 10 ml of phosphate-free DMEM, and 20 mM HEPES, pH 7.4, containing 1 mCi of [<sup>32</sup>P]orthophosphate, to label the intracellular ATP pool. After <sup>32</sup>P incorporation, cells were washed twice with DMEM to remove unincorporated radioactivity. Loaded cells were resuspended (1 × 10<sup>6</sup> cells/ml) in DMEM and incubated at 37° for 5 min with the indicated reagents. Cells were harvested and washed twice in ice-cold PBS before disruption and solubilization for 1 hr on an ice bath with 0.5 ml of lysis buffer (1% (v/v) Nonidet P-40, 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg/ml concentrations of leupeptin, pepstatin, chymostatin, and antipain). The solubilized preparation was centrifuged at 80,000 × *g* for 90 min, and the solubilized material (1 mg of protein/ml) was processed for immunoprecipitation, SDS-PAGE, and autoradiography as described previously (23).

For immunoblotting with anti-phospho-amino acid antibodies, cells were first stimulated at 37° in DMEM and then lysed as described above. Immunoprecipitation of A<sub>1</sub>Rs was carried out using the PC11 antibody. SDS-PAGE and immunoblotting were performed, as described previously (23), using anti-phospho-tyrosine (dilution, 1:2000), anti-phospho-serine (0.5 μg/ml), or anti-phospho-threonine antibody (1 μg/ml).



**Fig. 1. Modulation by (R)-PIA, PMA, or Cl $\phi$ -cAMP of the distribution of cell surface A<sub>1</sub>Rs.** Cells were treated with serum-free DMEM in absence (a) or presence of 50 nM (R)-PIA (b), 10 nM PMA (c), or 50 μM Cl $\phi$ -cAMP (d) for 15 min. After treatment, nonpermeabilized cells were fixed (4% paraformaldehyde) for 15 min and washed in PBS/20 mM glycine. The immunofluorescence staining was performed as indicated in Experimental Procedures using a fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>R (PC21 antibody; 100 μg/ml), and fluorescence on the cell surface was observed with a confocal microscope. A reconstruction obtained by superimposition of a number of images corresponding to horizontal sections of the cells is shown. Scale bars on bottom right, 10 μm.

**Statistical analysis.** Statistical comparisons were made using a two-tailed Student's *t* test.

## Results

**Agonist-induced clustering and internalization of cell surface A<sub>1</sub>Rs.** The distribution of A<sub>1</sub>Rs on the DDT<sub>1</sub>MF-2 cell surface was determined by immunofluorescence staining using PC21 antibody directed against a sequence of the second extracellular loop of A<sub>1</sub>Rs. The receptor distribution in nonpermeabilized cells, fixed with paraformaldehyde, was analyzed by confocal microscopy. An image corresponding to receptor distribution on the surface of these cells is shown in Fig. 1a. Confirmation that cells were not permeabilized was obtained through the lack of intracellular labeling when a section of the cell was analyzed and through the absence of specific labeling when using PC11 antibody, which is directed against an intracellular loop of the receptor (not shown). The antibody did not lead to specific labeling in cells that do not express A<sub>1</sub>Rs (Jurkat or CHO cells), whereas the labeling was present in CACO-2 cells, which express the receptor (Fig. 2). In comparison with DDT<sub>1</sub>MF-2 cell membranes [0.41 ± 0.03 pmol [<sup>3</sup>H](R)-PIA bound/mg of protein], the specific [<sup>3</sup>H](R)-PIA binding in Jurkat or CHO cell membranes was negligible (0.001 ± 0.001 and 0.003 ± 0.002, respectively), whereas it was moderate in CACO-2 cell membranes (0.06 ± 0.01). After cell exposure to the A<sub>1</sub>R agonist (R)-PIA (50 nM), bright punctate accumulations of antigen appeared, which is suggestive of receptor clustering in some parts of the membrane. Clustering appeared at short times (5 min) and was more evident after 15 or 45 min of (R)-PIA treatment (Fig. 1b). Confocal analysis of cells using fluorescein-conjugated PC21 antibody also indicated internalization of the receptor in response to chronic exposure to 50 nM (R)-PIA. Confocal microscopy permits scanning of multiple thin (1 μm) parallel sections through individual cells and facilitates optical separation of cytosolic from plasma membrane fluorescence. No significant receptor internalization was observed after 5 hr of incubation with 50 nM (R)-PIA (not shown). However, after 12 or 24 hr, cells showed a large number of internalized receptors in small intracellular vesicles (Fig. 3, c and d). No increase in receptor internalization was observed after 72 hr of (R)-PIA treatment; thus, the chronic exposure of cells to the adenosine agonist (R)-PIA led to a time-dependent translocation of

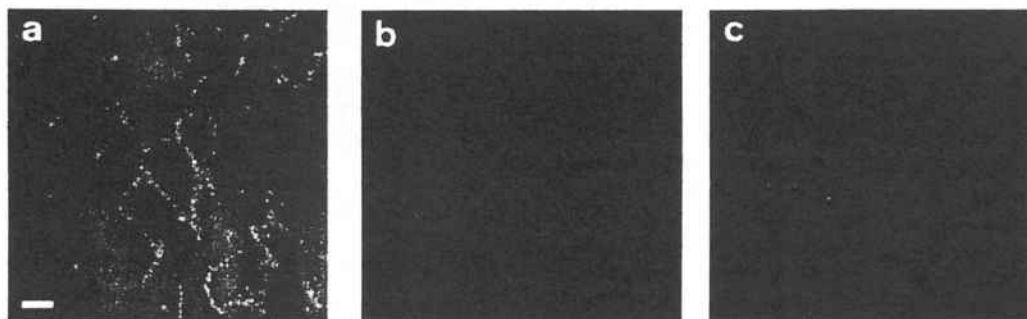
A<sub>1</sub>Rs to intracellular stores, which was evident at 5–12 hr and maximal at 12–48 hr of treatment.

**Phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells.** To analyze whether protein phosphorylation occurs in parallel to A<sub>1</sub>R clustering and internalization, the level of phosphorylation of A<sub>1</sub>R molecules was analyzed in naïve cells or in cells pretreated with the agonist. Phosphorylation was induced by a 5-min treatment with 50 nM (R)-PIA in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells metabolically labeled with <sup>32</sup>P<sub>i</sub> in serum-free medium. After the assay, A<sub>1</sub>R molecules were immunoprecipitated using the affinity-purified specific anti-A<sub>1</sub>R antibody PC11, which immunoprecipitates photoaffinity-labeled A<sub>1</sub>Rs in porcine brain cortex (28) and in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (29). The immunoprecipitate from untreated cells, analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, gave rise to a single phosphorylated band of 36 kDa corresponding to the A<sub>1</sub>Rs. No phosphorylated material of 36 kDa was immunoprecipitated using an irrelevant rabbit IgG. Under similar conditions, (R)-PIA induced a rapid increase in phosphorylation. Phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs was also observed when cells were treated with a PKC activator, PMA, or a PKA activator, Clφ-cAMP (Fig. 4).

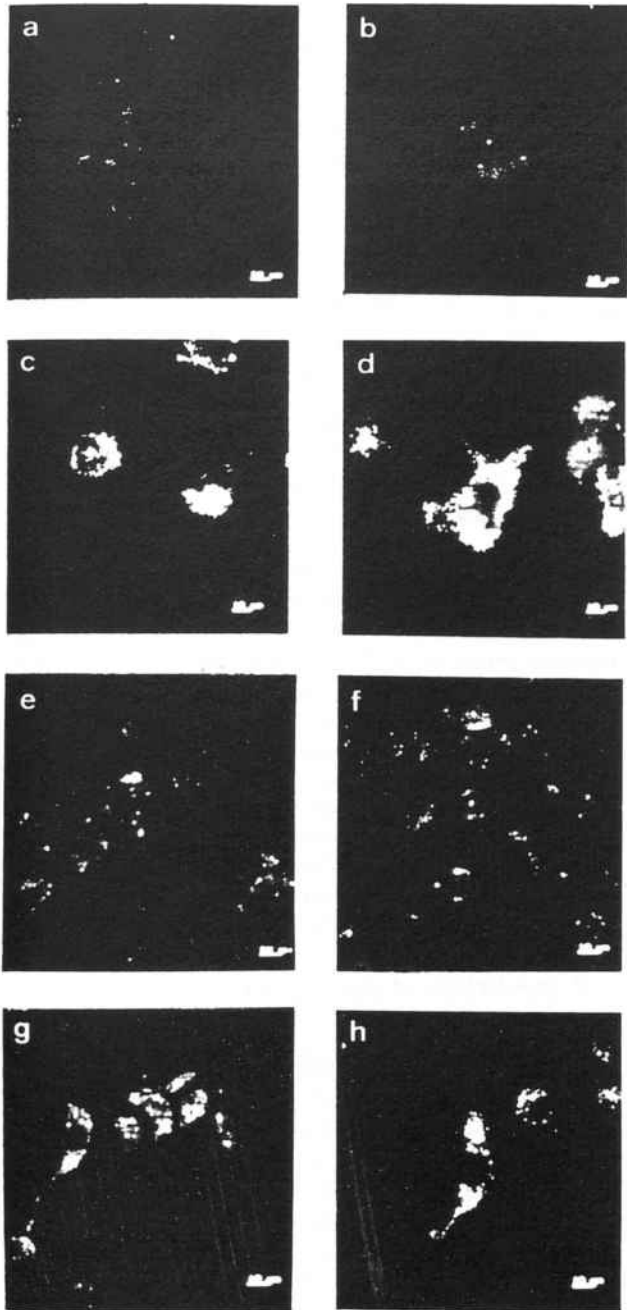
Immunoprecipitates were also analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against phospho-tyrosine, phospho-serine, or phospho-threonine (see Experimental Procedures). Activation of PKA or PKC led to phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs in serine and threonine. In contrast, ligand-induced activation of A<sub>1</sub>Rs led to phosphorylation of the receptor in tyrosine and, to a lesser extent, serine (Fig. 5). Therefore, A<sub>1</sub>Rs are susceptible to phosphorylation by various kinases depending on the stimulus.

To test whether receptor phosphorylation could be related to receptor clustering, immunocytochemical detection of A<sub>1</sub>Rs was performed on the surface of nonpermeabilized cells treated with Clφ-cAMP or PMA. Both compounds induced cell surface clustering of A<sub>1</sub>Rs (Fig. 1, c and d). In experiments using fluorescein-conjugated PC21 antibody, receptor internalization induced by the PKA or PKC activators was detected (Fig. 3, e–h).

**Desensitization and down-regulation of A<sub>1</sub>Rs.** The thermodynamic characteristics were examined of functional A<sub>1</sub>Rs present on the cell surface after agonist or antagonist pretreatment. Analysis of the equilibrium binding of [<sup>3</sup>H](R)-PIA to untreated DDT<sub>1</sub>MF-2 cells is consistent with one low affinity state for the receptor (Table 1). It has been suggested that the absence of high affinity sites in intact cells is due to



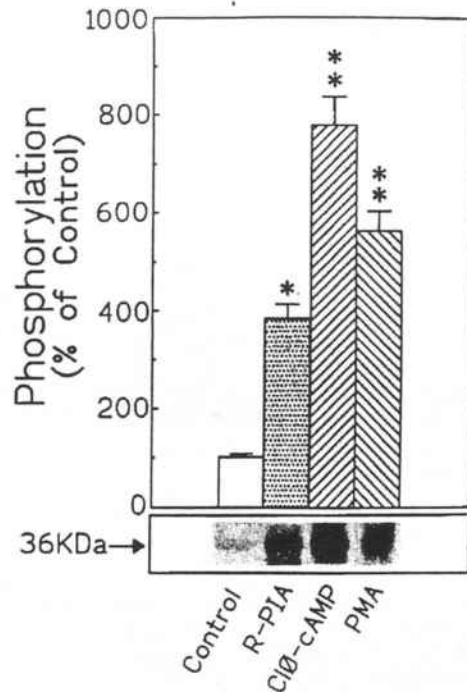
**Fig. 2.** Expression of A<sub>1</sub>Rs in CACO, Jurkat, and CHO cells. Cells, growing onto glass coverslips (a, CACO-2) or in suspension (b, Jurkat; c, CHO) were washed twice in PBS, fixed (4% paraformaldehyde) for 15 min, and washed in PBS/20 mM glycine. The immunofluorescence staining was performed as indicated in Experimental Procedures using a fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>R (PC21 antibody; 100 μg/ml), and fluorescence on the cell surface was observed with confocal microscopy. Representative images corresponding to a horizontal section at the middle of the cell are shown. Scale bar on bottom left, 10 μm.



**Fig. 3.** Internalization of cell surface A<sub>1</sub>Rs induced by (R)-PIA, PMA, or Cl $\phi$ -cAMP. Cells were grown in DMEM containing a fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>R (PC21 antibody; 5  $\mu$ g/ml) in the absence (a and b) or presence of 50 nM (R)-PIA (c and d), 10 nM PMA (e and f), or 50  $\mu$ M Cl $\phi$ -cAMP (g and h) for 12 (a, c, e, and g) or 24 (b, d, f, and h) hr. After treatment, cells were fixed, mounted in immunofluorescence medium, and observed with confocal microscopy. Images correspond to a horizontal section at the middle of the cell. Scale bars on bottom right, 10  $\mu$ m.

a high cellular concentration of GTP, which uncouples receptor from G proteins (4). After a 48-hr exposure to 50 nM (R)-PIA or 50 nM DPCPX, the equilibrium constant for [<sup>3</sup>H](R)-PIA binding did not change (Table 1). On the other hand, maximum binding decreased in (R)-PIA-treated cells, whereas it increased in DPCPX-treated cells (Table 1).

To analyze the receptor distribution in cells treated with agonists or antagonists, a set of binding experiments with



**Fig. 4.** Increase in basal phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs induced by ligand or activators of protein kinases. <sup>32</sup>P-loaded cells were preincubated for 5 min, in the presence of 0.2 unit/ml adenosine deaminase, with vehicle (Control), 50 nM (R)-PIA, 50  $\mu$ M Cl $\phi$ -cAMP, or 10 nM PMA. A<sub>1</sub>Rs were immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE. Arrow, electrophoretic band (36 kDa) corresponding to A<sub>1</sub>Rs. Receptor phosphorylation was quantitatively analyzed with a Computing Densitometer (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and expressed as percentage of the basal level of receptor phosphorylation seen in control cells. Data are mean  $\pm$  standard error from three separate experiments. \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.005$  compared with control.

radioligands and quantification of A<sub>1</sub>Rs molecules by immunoblotting and flow cytometry using antibodies against A<sub>1</sub>Rs were performed. Preincubation of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells with 50 nM (R)-PIA resulted in a time-dependent reduction in [<sup>3</sup>H](R)-PIA-specific binding sites. The loss was already evident after 3 hr of preincubation but reached a maximum (50%) at 48 and 72 hr (Fig. 6A). In contrast, chronic exposure of the cells to the adenosine receptor antagonist DPCPX (50 nM) resulted in an increase in [<sup>3</sup>H](R)-PIA-specific binding sites, which peaked (30%) at 24 hr and did not change during the following 24 hr of treatment. Furthermore, the antagonist DPCPX (50 nM) counteracted the agonist-induced loss of binding sites (Fig. 6A). To determine whether the variation of [<sup>3</sup>H](R)-PIA binding sites correlated with the presence of receptor molecules at the plasma membrane, flow cytometry experiments using the antibody PC21, directed against an extracellular epitope of A<sub>1</sub>Rs, were performed in nonpermeabilized cells pretreated with the agonist or antagonist. The lack of label when using the PC11 antibody, which was raised against an intracellular epitope of A<sub>1</sub>Rs, indicates that the plasma membrane was intact; therefore, the label obtained by using PC21 antibody is a direct measurement of the number of cell surface A<sub>1</sub>Rs (Fig. 6B). The 30% increase in [<sup>3</sup>H](R)-PIA binding sites in cells pretreated for 48 hr with 50 nM DPCPX correlated with a similar increase in intensity of fluorescence at the surface level (Fig. 6B, left). This is a characteristic feature of antagonist-induced up-regulation of A<sub>1</sub>Rs. On the other hand, the decrease in [<sup>3</sup>H](R)-PIA binding

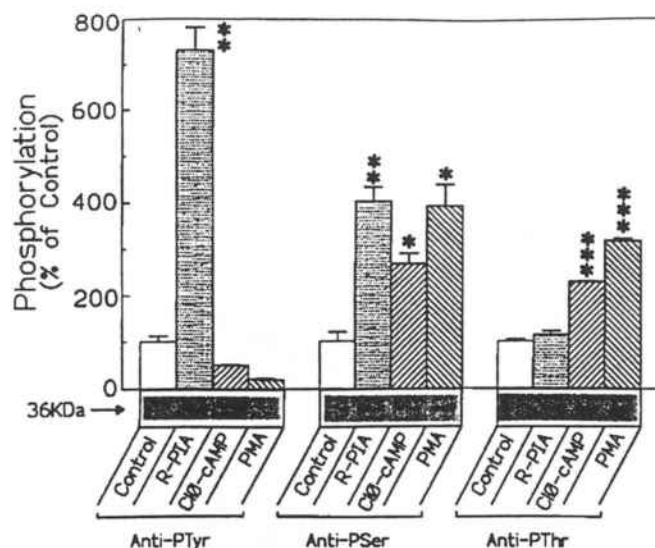


Fig. 5. Immunodetection of phospho-amino acids in  $A_1$ R $s$ . Cells were treated (10 min), in the presence of 0.2 unit/ml adenosine deaminase, with vehicle (Control), 50 nM (*R*)-PIA, 50  $\mu$ M Cl $\phi$ -cAMP, or 10 nM PMA. After cell lysis,  $A_1$ R $s$  were immunoprecipitated and treated as described in Experimental Procedures. Immunoblots were analyzed with anti-phospho-tyrosine, anti-phospho-serine, and anti-phospho-threonine. Arrow, electrophoretic band (36 kDa) corresponding to  $A_1$ R $s$ . Top, quantitative densitometric analysis of film from a representative experiment performed in triplicate using a Computing Densitometer (Molecular Dynamics). \*,  $p < 0.02$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  compared with control.

TABLE 1

Equilibrium dissociation constant and maximum binding of [ $^3$ H]-(*R*)-PIA to DDT $_1$ MF-2 cells after 48-hr exposure to (*R*)-PIA or DPCPX

Cells were incubated with or without 50 nM(*R*)-PIA or 50 nM DPCPX for 48 hr before [ $^3$ H]-(*R*)-PIA binding assays. Binding experiments and analysis of binding data were performed as described in Experimental Procedures. Data represent mean  $\pm$  standard error of three separate experiments.

Pretreatment	$K_d$	$B_{max}$
	nM	pmol/mg of protein
None	$7 \pm 1$	$0.17 \pm 0.01$
( <i>R</i> )-PIA	$8 \pm 1$	$0.09 \pm 0.01^b$
DPCPX	$8 \pm 2$	$0.22 \pm 0.02^a$

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.01$  compared with untreated cells.

sites found in cells pretreated for 48 hr with 50 nM (*R*)-PIA (50%) was higher than the decrease in fluorescence intensity (30%, Fig. 6B, left). These results suggest that after (*R*)-PIA treatment of the cells, 30% of the receptor molecules disappear from the cell surface and the remaining 20% of cell surface  $A_1$ R $s$  molecules are unable to bind ligands.

To determine whether the (*R*)-PIA-induced disappearance of  $A_1$ R $s$  from the cell surface was due to a down-regulation of the receptor, the total number of  $A_1$ R $s$  molecules present in DDT $_1$ MF-2 cells pretreated with 50 nM (*R*)-PIA or 50 nM DPCPX was quantified by immunoblotting. After 48 hr of agonist treatment, a 20% decrease in  $A_1$ R label was observed, whereas a 30% decrease was seen after 72 hr of treatment (Fig. 7A). The agonist-induced reduction in receptor molecules detected by immunoblotting appeared later than the reduction detected by [ $^3$ H]-(*R*)-PIA-specific binding assays. The 20% down-regulation (reduction in the number of receptor molecules per cell) of  $A_1$ R $s$  after 48 hr of 50 nM (*R*)-PIA treatment was confirmed by flow cytometry using permeab-

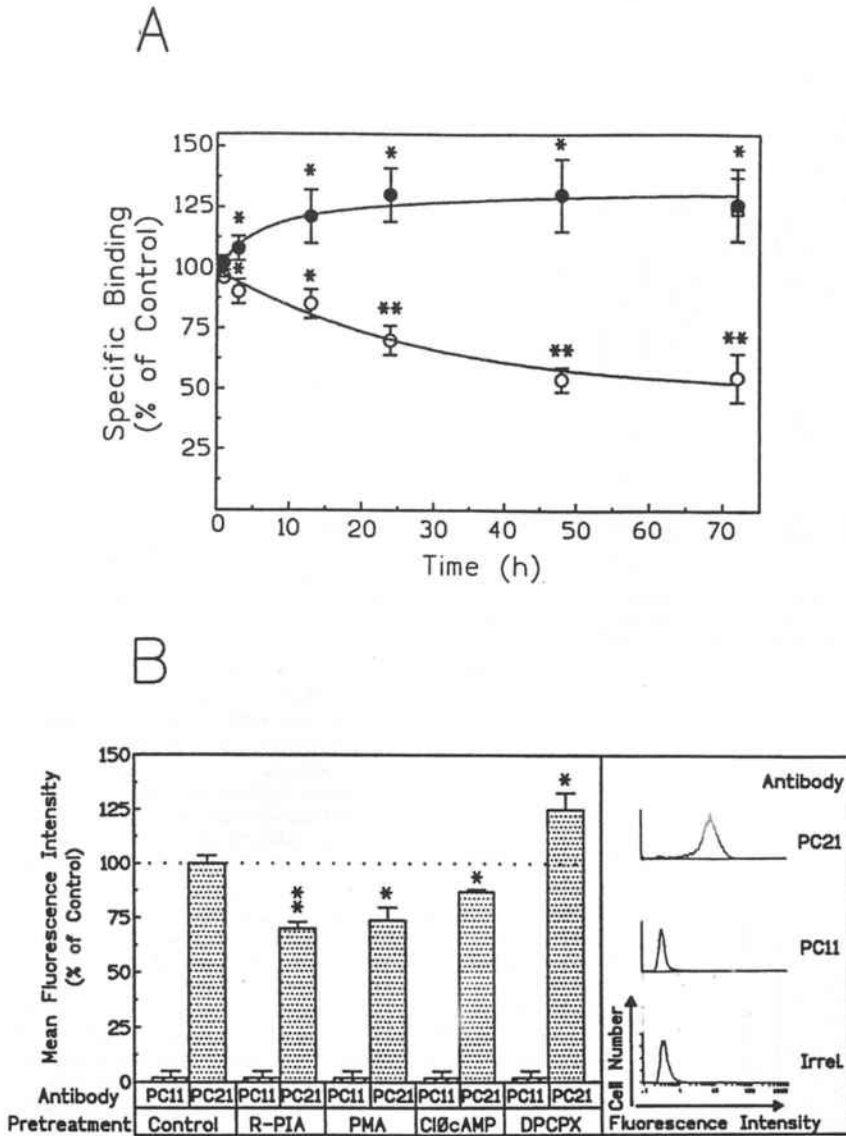
ilized cells and either of the two antibodies, PC21 and PC11, which recognize an extracellular and an intracellular epitope, respectively, of  $A_1$ R $s$  (Fig. 7B). On the other hand, pretreatment of cells with the antagonist had no effect on the total number of  $A_1$ R $s$  molecules detected by immunoblotting.

**Functional consequences of desensitization.** Experiments of second messenger production were carried out to analyze the effect of desensitization on signaling via  $A_1$ R $s$ . In DDT $_1$ MF-2 cells, (*R*)-PIA increased the level of [ $^3$ H]inositol phosphates and mobilized intracellular calcium in a concentration-dependent manner, with  $EC_{50}$  values of  $8 \pm 2$  and  $11 \pm 2$  nM, respectively (Table 2). Chronic treatment (48 hr) with 50 nM (*R*)-PIA reduced the agonist-induced [ $^3$ H]inositol phosphate accumulation and calcium peak by 35% without changing the  $EC_{50}$  values (Table 2). On the other hand, no significant changes were observed in agonist-induced second messenger production after 50 nM DPCPX pretreatment of cells (Table 2). These results indicate that the DPCPX-induced appearance of  $A_1$ R $s$  on the cell surface was not related to potentiation of signal transduction events in response to a saturating concentration of agonist.

The effect of activators of PKA or PKC in functional short term desensitization of  $A_1$ R $s$  was analyzed at 5 min of preincubation with Cl $\phi$ -cAMP or PMA. The results were compared with those obtained after preincubation with 50 nM (*R*)-PIA. Treated cells were washed, and  $A_1$ R $s$  were activated using 50 nM (*R*)-PIA. In all cases, treated cells responded less to the stimuli than did cells preincubated with buffer alone. Quantitatively, the effect of pretreatment with either Cl $\phi$ -cAMP or PMA was higher than the effect of 5-min pretreatment with the agonist in both calcium mobilization and inositol phosphate accumulation (Fig. 8). These results indicate that functional short term desensitization of  $A_1$ R $s$  can be mimicked by activation of serine/threonine kinases.

## Discussion

In the study of G protein-coupled receptors, attenuation of agonist binding and agonist-induced signaling is classically observed after chronic agonist stimulation of the receptor (30). This attenuation is known as desensitization and is absolutely required to achieve the refractory period that follows long term exposure to an agonist. In addition to a rapid functional uncoupling between binding and second messenger generation, there is a slower event, which results in the unavailability of binding sites caused by internalization or sequestration of the receptor. DDT $_1$ MF-2 cells constitute a natural cell model in which chronic activation of  $A_1$ R $s$  with agonist produces a decrease in total receptor number, which is associated with a functional desensitization in terms of  $A_1$ R-mediated inhibition of adenylate cyclase activity (22). In the current study, the redistribution of receptors between cell surface and intracellular compartments was studied in agonist-treated cells. The generation of antibodies against  $A_1$ R $s$  able to detect receptor molecules by immunostaining made this study possible. Using these antibodies in immunocytochemical experiments analyzed by confocal microscopy and flow cytometry, we show that chronic activation of  $A_1$ R $s$  induces a rapid receptor clustering on the DDT $_1$ MF-2 cell surface that is followed by receptor internalization. The agonist-induced internalization was detected by the presence of small intracellular vesicles containing fluorescein-conju-



**Fig. 6.** Ligand-induced modulation of the A<sub>1</sub>R cell surface expression. **A**, Binding experiments with cells preincubated with 50 nM (*R*)-PIA or 50 nM DPCPX. The concentration of the ligand [<sup>3</sup>H](*R*)-PIA was 5 nM. Data are mean ± standard deviation of four separate experiments performed in triplicate. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.005 compared with binding at zero time. **B**, Flow fluorocytometry of surface A<sub>1</sub>Rs. Untreated cells (control) or cells preincubated with 50 nM (*R*)-PIA, 50 nM DPCPX, 10 nM PMA, or 50 μM Clβ-cAMP for 48 hr were washed, fixed, and analyzed as described in Experimental Procedures. As a control, an irrelevant (*Irrel.*) rabbit IgG was used. **Left**, mean fluorescein fluorescence from 5000 cells was measured, and the mean ± standard deviation value of triplicate determinations was presented as percentage of control cells. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01 compared with control. **Right**, intensity of A<sub>1</sub>R fluorescence in nonpermeabilized cells (representative experiment).

gated anti-A<sub>1</sub>R antibody complexes. To determine whether A<sub>1</sub>Rs sequestering into intracellular compartments led to receptor degradation, immunoblotting assays were used to quantify the total content of the receptor in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells treated or not treated with (*R*)-PIA. Results (Fig. 7) indicate that there is an agonist-induced loss in the total content of A<sub>1</sub>Rs (down-regulation), which is slower than the agonist-induced internalization. These findings agree with the hypothesis that some of the internalized G protein-coupled receptors are targeted for degradation, whereas others are recycled back to the cell surface (29). As occurs with 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptors, which in response to the agonist are internalized via the endosome pathway (16), (*R*)-PIA-induced internalization of A<sub>1</sub>Rs is prevented by the antagonist (Fig. 6A) and does not occur at 4° (not shown).

The disappearance of binding sites from the cell surface at 48 hr of agonist treatment was only partly due to receptor internalization. In fact, the reduction of [<sup>3</sup>H](*R*)-PIA binding sites was higher than the decrease in fluorescence intensity due to cell surface receptors detected by flow cytometry. Because this discrepancy is not due to changes in the *K<sub>d</sub>* value for (*R*)-PIA binding before and after the chronic acti-

vation of A<sub>1</sub>Rs (Table 1), these results indicate the presence of cell surface receptors in a state of unresponsiveness [i.e., receptor molecules that do not bind (*R*)-PIA and are not coupled to the signal transduction machinery]. The presence of these desensitized cell surface receptors is predicted by the cluster-arranged cooperative model, which accounts for the kinetic of binding to A<sub>1</sub>Rs (31). The model consists of two different conformations of the receptor in an equilibrium that depends on the ligand concentration. According to this model of negative cooperativity, high concentrations of agonists would lead to undetectable binding sites due to a very low affinity of some of the receptor molecules for the ligand (31).

The results presented here also show that incubation of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells with the A<sub>1</sub>R agonist (*R*)-PIA induced a rapid increase in receptor phosphorylation, which correlated with the ligand-induced clustering of the receptor at the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (Figs. 1b, 3, and 4). Functional uncoupling of G protein-coupled receptors often seems to be triggered by phosphorylation (see Ref. 5 for a review). There are, however, exceptions, such as secretin receptors, whose major mechanism of desensitization consists of phosphorylation-independent receptor internalization (32). Interestingly,

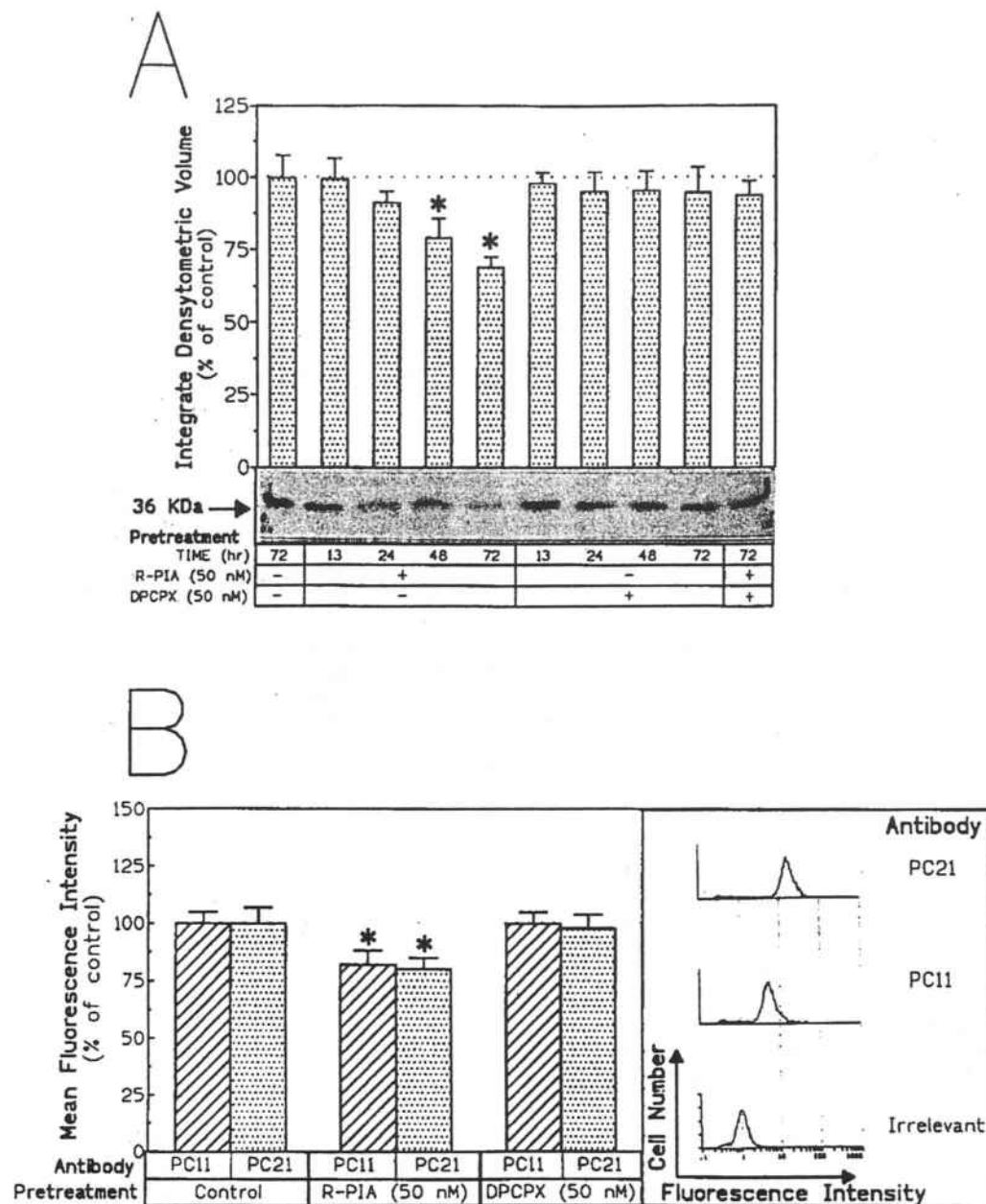


Fig. 7. Down-regulation of  $A_1$ Rs in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. A, Cells were grown in the absence or presence of 50 nM (*R*)-PIA or 50 nM DPCPX for the indicated time. Cells were then washed twice in cold PBS before disruption by treatment with SDS-PAGE sample buffer. Equal amounts of protein (20  $\mu$ g of protein) were applied to each lane and electrophoresed in SDS-containing buffer. Immunoblotting was performed using PC11 antibody as described in Experimental Procedures. Arrow, electrophoretic band (36 kDa) corresponding to the  $A_1$ Rs. The amount of receptor was quantitatively analyzed with a Computing Densitometer (Molecular Dynamics) and expressed as percentage of the amount found in control cells. Data are mean  $\pm$  standard deviation from three separate experiments. \*,  $p < 0.05$  compared with control. B, Flow fluorocytometry of total  $A_1$ Rs in permeabilized cells. Untreated cells (control) or cells preincubated with 50 nM (*R*)-PIA or 50 nM DPCPX for 48 hr were washed, fixed, permeabilized, and analyzed by flow cytometry as described in Experimental Procedures. As a control, an irrelevant rabbit IgG was used. Left, mean fluorescein fluorescence from 5000 cells was measured, and the mean  $\pm$  standard deviation value of triplicate determinations was presented as percentage of control cells. \*,  $p < 0.05$  compared with control. Right, intensity of  $A_1$ R fluorescence in permeabilized cells (representative experiment).

TABLE 2

**Agonist-induced [ $^3$ H]inositol phosphate accumulation and calcium mobilization in cells pretreated with (*R*)-PIA or DPCPX**

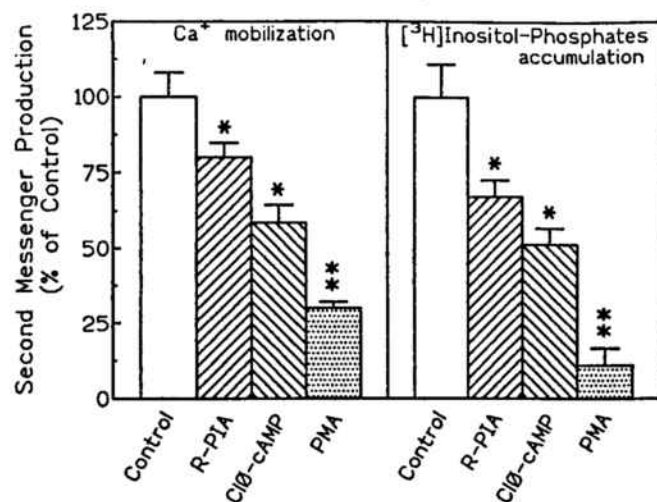
(*R*)-PIA-induced [ $^3$ H]inositol phosphate and intracellular calcium accumulation in cells incubated with or without 50 nM (*R*)-PIA or 50 nM DPCPX (48 hr) was determined as described in Experimental Procedures. Values are mean  $\pm$  standard error from three separate experiments.

Pretreatment	[ $^3$ H]inositol phosphate accumulation		Calcium peak induction	
	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub>
	nM	% of Control	nM	% of Control
None	8 $\pm$ 2	100 $\pm$ 9	11 $\pm$ 2	100 $\pm$ 6
( <i>R</i> )-PIA	10 $\pm$ 2	70 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	19 $\pm$ 7	65 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
DPCPX	7 $\pm$ 1	110 $\pm$ 7	15 $\pm$ 6	101 $\pm$ 2

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ , <sup>b</sup>  $p < 0.02$  compared with untreated cells.

substitution by alanine of candidate residues for phosphorylation of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors by  $\beta$ -adrenergic receptor kinase abolished the effect of epinephrine on adenylate cy-

clase activity without affecting internalization (33). In the case of  $A_1$ Rs, it is likely that phosphorylation (in serine/threonine and/or tyrosine) is related to short term clustering and desensitization and/or to internalization. This hypothesis is deduced from the fact that activators of PKA or PKC mimicked the effect of the chronic activation of  $A_1$ Rs in clustering, functional desensitization, and sequestration of the receptors in intracellular vesicles (Figs. 1, 3, and 8). Despite a similar effect in internalization, the activators of PKA and PKC led to a more extensive desensitization than the  $A_1$ R agonist. This may be due to the need of phosphorylation in threonine for an efficient short term desensitization. In fact, (*R*)-PIA does not lead to significant levels of phosphothreonine-containing  $A_1$ Rs (Fig. 5). Potential phosphorylation sites for PKC and PKA are found in the third intracellular loop of the receptor (28); a single consensus sequence for PKA phosphorylation is also present in the second intracel-



**Fig. 8.** Agonist-induced [<sup>3</sup>H]inositol phosphate accumulation and calcium mobilization in cells pretreated with (R)-PIA, Clφ-cAMP, or PMA. For intracellular calcium measurement, cells loaded with 5 μM Fura-2 AM for 30 min at 37°, washed, and resuspended in HBSS for 30 min were preincubated (5 min at 37°) with 50 nM (R)-PIA, 50 μM Clφ-cAMP, or 10 nM PMA. Cells, extensively washed, were resuspended in HBSS containing 0.2 unit/ml ADA, and calcium peak induction was achieved by the addition of 50 nM (R)-PIA. For the phosphoinositide assay, cells (0.5–1 × 10<sup>5</sup>/ml) were grown (40–48 hr) in inositol-free medium containing myo-[<sup>3</sup>H]inositol (5 μCi/ml). Cells were then incubated with 50 nM (R)-PIA, 50 μM Clφ-cAMP, or 10 nM PMA for 5 min at 37°; washed twice in prewarmed (37°) PBS containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>; and incubated (10 min) with 10 mM LiCl containing 0.2 unit/ml ADA. The phosphoinositide production was initiated by the addition of prewarmed PBS containing (R)-PIA (50 nM final concentration), 10 mM LiCl, and 0.2 unit/ml ADA. After 30 min, the assay was ended by perchloric acid protein precipitation (30 min on ice), and total inositol phosphates were determined as described in Experimental Procedures. Decreases in second messenger production were expressed as percentages relative to a control of (R)-PIA-induced second messenger production performed in cells preincubated with medium alone [i.e., in the absence of (R)-PIA, Clφ-cAMP, or PMA]; cells for these control assays were subjected to a similar treatment (washes and resuspensions) as cells incubated in the presence of (R)-PIA, Clφ-cAMP, or PMA. Data are mean ± standard deviation of three separate experiments performed in triplicate. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.01.

lular loop (28). On the other hand, A<sub>1</sub>R is a putative substrate for β-adrenergic receptor kinase (34) and, perhaps, for other G protein-coupled receptor kinases.

The β<sub>1</sub>- and β<sub>2</sub>-adrenergic receptors desensitize faster than β<sub>3</sub>-adrenergic receptors. This different behavior has been attributed to the susceptibility of the carboxyl-terminal region of these proteins to phosphorylation by serine/threonine kinases. Thus, β<sub>3</sub>-adrenergic receptors do not contain serine or threonine in their carboxyl-terminal end (35, 36). Similarly, mutation of carboxyl-terminal threonine residues in human m3 muscarinic receptor modulates the extent of sequestration and desensitization (13). Interestingly, the absence from A<sub>1</sub>R of serine and threonine residues near the carboxyl terminus, which are present in several G protein-coupled receptors, does not prevent a rapid ligand-induced desensitization. However, the lack of serine/threonine residues in the carboxyl-terminal cytoplasmic tail would be related to the slow internalization of A<sub>1</sub>R after cell exposure to (R)-PIA or activators of PKA or PKC. In fact, the major difference between A<sub>1</sub>R and other G protein-coupled receptors is the slow kinetics of agonist-induced internalization (sequestration). For most receptors, this is rapid, usually

maximal at 30 min, whereas for A<sub>1</sub>R, maximal internalization occurs between 12 and 48 hr after agonist treatment. We have evidence that internalization of A<sub>1</sub>R in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells does not take place by means of clathrin-coated vesicles but may be mediated by other components of the endosomal pathway.<sup>2</sup>

Agonist-stimulated phosphorylation of adenosine receptors in tyrosine has not been reported previously. To our knowledge, there is only one other member of the family of G protein-coupled receptors, the type 1 angiotensin II receptor, whose basal level of tyrosine phosphorylation is enhanced by the agonist (37). Although it cannot be ruled out that tyrosine phosphorylation is involved in short term desensitization, the fact that serine/threonine kinases mimic the ligand-induced clustering and functional desensitization of the receptor makes the involvement of tyrosine phosphorylation in these events unlikely. Mechanistically, activation of a protein tyrosine kinase by ligands of G protein-coupled receptors might be mediated by the βγ subunits of G proteins (38). This is a novel mechanism by which signal transduction via G protein-coupled receptors can be linked to mitogen-activated protein kinase activation (38, 39). Classic pathways of mitogen-activated protein kinase activation require interaction of SH2-containing proteins with phospho-tyrosine residues present in receptors with tyrosine kinase activity or in receptors associated with Src-related tyrosine kinases. By analogy, the physiological role of tyrosine phosphorylation of A<sub>1</sub>R might be related to signaling via SH2-containing proteins.

#### Acknowledgments

We thank Robin Rycroft (Serinevei d'Assessorament de la Universitat de Barcelona) for excellent technical assistance in preparation of the manuscript. We thank Catalina Relañó (Serinevei de Cultius Celulars) and Susana Castel and Jaume Comas (Serineveis Científico-Tècnics) for their technical assistance.

#### References

- Palmer, T. M., and G. L. Stiles. Adenosine receptors. *Neuropharmacology* 34:683–694 (1995).
- Freissmuth, M., W. Schutz, and M. Linden. Interactions of bovine brain A<sub>1</sub>-adenosine receptor with recombinant protein a subunits: selectivity for rG<sub>iα-3</sub>. *J. Biol. Chem.* 266:17778–17783 (1991).
- Munshi, R., I.-H. Pang, P. C. Sternweis, and J. Linden. A<sub>1</sub> adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub> and G<sub>o</sub>. *J. Biol. Chem.* 266:22285–22289 (1991).
- Gerwins, P., C. Nordstedt, and B. B. Fredholm. Characterization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in intact DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 38:660–666 (1990).
- Ferguson, S. S. G., L. S. Barak, J. Zhang, and M. G. Caron. G-protein coupled regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74:1095–1110 (1996).
- Lohse, M. J., S. Andexinger, J. Pitcher, S. Trukawinski, J. Codina, J. P. Fraure, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz. Receptor specific desensitization with purified protein kinase: dependence and receptor specificity of β-arrestin and arrestin in β<sub>2</sub>-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J. Biol. Chem.* 267:8558–8564 (1992).
- Okamoto, T., Y. Murayama, Y. Hayashi, M. Inagaki, E. Ogata, and I. Nishimoto. Identification of a G<sub>s</sub> activator region of the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* 67:1–20 (1991).
- Post, S. R., O. Aguila-Buhain, and P. A. Insel. A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the β<sub>2</sub>-adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 271:895–900 (1996).
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, M. G. Caron, M. G., and R. J. Lefkowitz. Multiple pathways of rapid β<sub>2</sub>-adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J. Biol. Chem.* 265:3202–3209 (1990).
- Longabaugh, J. P., J. Didsbury, A. Spiegel, and G. L. Stiles. Modification

<sup>2</sup> F. Ciruela, C. Saura, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluis, and R. Franco, unpublished observations.

- of the rat A<sub>1</sub> adenosine receptor adenylate cyclase during chronic exposure to an adenosine receptor agonist. *Mol. Pharmacol.* 36:681-688 (1989).
11. Ménard, L., S. S. G. Ferguson, L. S. Barak, L. Bertrand, R. T. Premont, A.-M. Colapietro, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron. Members of the G protein-coupled receptor kinase family that phosphorylate  $\beta_2$ -adrenergic receptor facilitate sequestration. *Biochemistry* 35:4155-4160 (1996).
  12. Zhang, J., S. S. G. Ferguson, L. S. Barak, L. Ménard, and M. G. Caron. Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 271:18302-18305 (1996).
  13. Yang, J., J. A. Williams, D. I. Yule, and C. D. Logsdon. Mutation of carboxyl-terminal threonine residues in human m3 muscarinic acetylcholine receptor modulates the extent of sequestration and desensitization. *Mol. Pharmacol.* 48:477-485 (1995).
  14. Bogatkewitsch, G. S., W. Lenz, K. H. Jacobs, and C. J. van Koppen. Receptor internalization delays m4 muscarinic acetylcholine receptor resensitization at the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.* 50:424-429 (1996).
  15. Smit, M. J., H. Timmerman, A. E. Alewijnse, A. Punin, I. Van den Nieuwenhof, J. Blauw, J. van Minnen, and R. Leurs. Visualization of agonist-induced internalization of histamine H<sub>2</sub> receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:1138-1145 (1995).
  16. Berry, S. A., M. C. Shah, N. Khan, and B. L. Rot. Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor occurs via the endosome pathway *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* 50:306-313 (1996).
  17. Palmer, T. M., T. W. Gettys, K. A. Jacobson, and G. L. Stiles. Desensitization of canine A<sub>2A</sub> receptor: delineation of multiple processes. *Mol. Pharmacol.* 45:1082-1094 (1994).
  18. Shryock, J., A. Patel, L. Bellardinelli, and J. Linden. Down-regulation and desensitization of A<sub>1</sub>-adenosine receptors in embryonic chicken heart. *Am. J. Physiol.* 256:H321-H327 (1989).
  19. Palmer, T. M., J. L. Benovic, and G. L. Stiles. Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A<sub>3</sub> adenosine receptor: evidence for a G protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 270:29607-29613 (1995).
  20. Ruiz, A., J. M. Sanz, G. González-Calero, M. Fernández, A. Andrés, A. Cubero, and M. Ros. Desensitization and internalization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat brain by *in vivo* treatment with R-PIA: involvement of coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1310:168-174 (1996).
  21. Barraco, R. A., C. Clough-Helfman, B. P. Goodwin, and G. F. Anderson. Evidence for presynaptic adenosine A<sub>2A</sub> receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus-tractus-solitarius. *J. Neurochem.* 65:1604-1611 (1995).
  22. Ramkumar, V., M. E. Olah, K. A. Jacobson, and G. L. Stiles. Distinct pathways of desensitization of A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-adenosine receptors in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* 40:639-647 (1991).
  23. Ciruela, F., V. Casadó, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís, and R. Franco. Immunological identification of A<sub>1</sub> adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* 42:818-829 (1995).
  24. Sorensen, K., and U. Brodbeck. A sensitive protein assay using micro-titer plates. *Experientia* 42:161-162 (1986).
  25. Casadó, V., C. Cantí, J. Mallol, E. I. Canela, C. Lluís, and R. Franco. Solubilization of A<sub>1</sub> adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* 26:461-473 (1990).
  26. Grynkiwicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450 (1985).
  27. Berridge, M. J., R. M. C. Dawson, C. P. Downes, J. P. Helson, and R. R. Irvine. Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *Biochem. J.* 212:473-492 (1983).
  28. Olah, M. E., H. Ren, J. Ostrowski, K. A. Jacobson, and G. L. Stiles. Cloning, expression, and characterization of the unique bovine A<sub>1</sub> adenosine receptor: studies on the ligand binding site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267:10764-10770 (1992).
  29. Ciruela, F., C. Saura, E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco. Adenosine deaminase affects ligand-induced signaling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Lett.* 380:219-223 (1996).
  30. Lohse, M. J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta* 1179:171-188 (1993).
  31. Franco, R., V. Casadó, F. Ciruela, J. Mallol, C. Lluís, and E. I. Canela. The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for the kinetics of binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Biochemistry* 35:3007-3015 (1996).
  32. Holtmann, M. H., B. F. Roettger, D. I. Pinon, and L. J. Miller. Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *J. Biol. Chem.* 271:23566-23571 (1996).
  33. Eason, M. G., S. Moreira, and S. B. Liggett. Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for  $\beta$ -adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 270:4681-4688 (1995).
  34. Ramkumar, V., M. Kwatra, J. L. Benovic, and G. L. Stiles. Functional consequences of A<sub>1</sub> adenosine-receptor phosphorylation by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1179:89-97 (1993).
  35. Giacobino, J.-P.  $\beta_3$ -Adrenoceptor: an update. *Eur. J. Endocrinol.* 132:377-385 (1995).
  36. Marullo, S., F. Nantel, A. D. Strosberg, and M. Bouvier. Variability in the regulation of beta-adrenoceptor subtypes. *Biochem. Soc. Transm.* 23:126-129 (1995).
  37. Kai, H., K. K. Griendling, B. Lassègue, J. D. Ollerenshaw, M. S. Runge, and R. W. Alexander. Agonist-induced phosphorylation of the vascular type I angiotensin II receptor. *Hypertension (Dallas)* 24:523-527 (1994).
  38. Post, S. R., and J. H. Brown. G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB J.* 10:741-749 (1996).
  39. Dikic, I., G. Tokiwa, S. Lev, S. A. Courtneidge, and J. Schlessinger. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature (Lond.)* 383:547-550 (1996).

Send reprint requests to: Prof. Rafael Franco, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Química, Martí i Franquès, 1-08028 Barcelona, Spain. E-mail: r.franco@sun.bq.ub.es



**3.4. Adenosine deaminase and A<sub>1</sub> adenosine receptors are internalized together following agonist-induced receptor desensitization.**

Carlos Saura, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Carmen Lluís and Rafael Franco.

*Journal of Biological Chemistry* (Submitted, 1997)

# Adenosine Deaminase and A<sub>1</sub> Adenosine Receptors are Internalized Together Following Agonist-Induced Receptor Desensitization

Carlos Saura, Josefa Mallol, Enric I. Canela, Carmen Lluís and Rafael Franco.

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Química. Univ. Barcelona. Barcelona. Catalunya. Spain.

## SUMMARY

A<sub>1</sub> adenosine receptors (A<sub>1</sub>Rs) and adenosine deaminase (ADA; EC 3.5.4.4) interact on the cell surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells. The interaction facilitates ligand binding and signaling via A<sub>1</sub>R but it is not known whether it has a role in homologous desensitization of A<sub>1</sub>Rs. Here we show that chronic exposure of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells to the A<sub>1</sub>R agonist, R-PIA, caused a rapid aggregation or *clustering* of A<sub>1</sub> receptor molecules on the cell membrane which was enhanced by pretreatment with ADA. Colocalization between A<sub>1</sub>R and ADA occurred in the R-PIA-induced clusters. Interestingly, colocalization between A<sub>1</sub>R and ADA also occurred in intracellular vesicles after internalization of both protein molecules in response to R-PIA. Agonist-induced aggregation of A<sub>1</sub>Rs was mediated by phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs which was enhanced and accelerated in the presence of ADA. Ligand-induced second-messenger desensitization of A<sub>1</sub>Rs was also accelerated in the presence of exogenous ADA and it correlated well with receptor phosphorylation. However, despite phosphorylation of A<sub>1</sub>R returned to its basal state within minutes, desensitization continued for hours. The loss of cell surface binding sites (sequestration) induced by the agonist was time-dependent ( $t_{1/2} = 10 \pm 1$  h) and was accelerated by ADA. All these results strongly suggest that ADA plays a key role in the regulation of A<sub>1</sub>Rs by accelerating ligand-induced desensitization and internalization and provides evidence that the two cell surface proteins are internalized by the same endocytic pathway.

Adenosine is an autocooid that exerts its physiological actions through specific cell surface receptors. Four adenosine receptors (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>), belonging to the family of G protein-coupled receptors, have been cloned and pharmacologically characterized (1). Acting through different adenosine receptors, adenosine is a neuromodulator in both the central and peripheral nervous system (2,3). Via A<sub>1</sub> adenosine receptors (A<sub>1</sub>Rs), adenosine reduces heart rate (4), glomerular filtration rate and renin release in the kidney (5), it induces bronchoconstriction (6,7) and inhibits lipolysis. A<sub>1</sub>Rs can be coupled to different pertussis toxin-sensitive G proteins (8,9,10), which mediate inhibition of adenylyl cyclase (11) and regulate Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>-channels and inositol phosphate metabolism (1). A<sub>1</sub>R displays two different affinities for agonist, which have been classically attributed to a different coupling to heterotrimeric G proteins (12). In this two-independent site model, coupled receptor-G protein complexes display high affinity for agonists ( $K_d = 0.1-0.2$  nM) and

uncoupled receptors display low affinity (1-2nM) (12,13). The recently reported cluster-arranged cooperative model predicts that the high- and low-affinity sites are a consequence of the negative cooperativity of agonist binding and seems not be related to the content of free and G protein-coupled receptors (14). According to the cluster arranged cooperative model, the agonist-induced conversion of the high to the low-affinity state may partially explain the ligand-induced desensitization of A<sub>1</sub>R (14,15).

Receptors belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) family are desensitized and down-regulated in response to agonist stimulation.  $\beta_2$ -adrenergic receptors ( $\beta_2$ ARs) constitute the best characterized system within the GPCR family. Agonist-induced  $\beta_2$ AR desensitization is caused by a

The abbreviations used are: A<sub>1</sub>R, A<sub>1</sub> adenosine receptor; ADA, adenosine deaminase; R-PIA, R-phenylisopropyladenosine; DPCPX, 1, 3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine; FITC, fluorescein isothiocyanate; TRITC, rhodamine isothiocyanate.

conformational change of the agonist-occupied receptor that facilitates receptor phosphorylation by second messenger-activated kinases (i.e. PKA) or G-protein coupled receptor kinases (GRKs) (16,17). Following  $\beta_2$ AR phosphorylation,  $\beta$ -arrestin binds to the phosphorylated receptor and uncouples the receptor from the heterotrimeric G proteins (18,19).  $\beta$ -arrestin not only desensitizes the receptor but also functions as clathrin adaptor mediating receptor sequestration, i.e. receptor internalization towards intracellular compartments (20,21). Although sequestration is not required for phosphorylation and desensitization, it appears to be necessary for dephosphorylation and resensitization of  $\beta_2$ ARs (22,23).

Like other GPCR members,  $A_1$ R expression is regulated in response to agonist or antagonist stimulation. Desensitization of  $A_1$ R has been described in intact animals and in cell cultures. Prolonged administration of  $A_1$ R agonists to animals cause functional desensitization of  $A_1$ R in guinea pig heart (24), rat adipocytes (25), rat atrial muscle (26) and rat brain (27,28). The reduced functional response is due to a net loss of  $A_1$ Rs or *down-regulation*, a decrease in the proportion of  $A_1$ R displaying the high-affinity state for agonists and a decrease in the content of  $G_i$  proteins. Growth of rat adipocytes or smooth-muscle DDT<sub>1</sub>MF-2 cells in the presence of R-PIA leads to the desensitization and down-regulation of  $A_1$ R (29) along with  $G_i$   $\alpha$ -subunits (30,31). We have recently shown that treatment of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells with the agonist R-PIA induces a rapid phosphorylation and clustering of  $A_1$ Rs. The loss of binding sites on the cell membrane due to internalization of  $A_1$ R is a slower event occurring within hours. Since activators of protein kinase A or C mimicked the effect of the ligand, Ser/Thr phosphorylation seems to be related to short-term clustering and desensitization as well as to long-term internalization of  $A_1$ R (32).

A new perspective about the coupling of  $A_1$ R to G proteins has been recently given. Ecto-adenosine deaminase (ecto-ADA; EC 3.5.4.4), enzyme capable of degrading adenosine to inosine on the cell surface (33, for review), was shown to modulate ligand binding and signaling through  $A_1$ Rs on DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (34). In a catalytically-independent fashion ADA seems to be necessary for a high-affinity binding of adenosine to  $A_1$ R (35).

In this work, the effect of ADA in the ligand-mediated regulation of  $A_1$ R in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells has been studied. ADA affected both desensitization and internalization of  $A_1$ Rs. Moreover, by means of immunocytochemistry, confocal microscopy and flow cytometry using antibodies against  $A_1$ R and ADA, we found that  $A_1$ R and ADA colocalize and, after receptor activation, they cluster on the cell surface and internalize into the cells using the same endocytic pathway. All these results evidence a concerted modulation of ADA and  $A_1$ R in response to receptor agonists.

## EXPERIMENTAL METHODS

**Materials.** [Adenine-2,8-<sup>3</sup>H,ethyl-2-<sup>3</sup>H]phenyl-isopropyl adenosine (<sup>3</sup>H]R-PIA) (36Ci/mmol), was obtained from Amersham (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). [<sup>32</sup>P]orthophosphate (<sup>32</sup>P<sub>i</sub>) was from New England Nuclear Research Products (Boston, MA, USA). N<sup>6</sup>-(R)-(phenyl isopropyl)adenosine (R-PIA), pepstatin, leupeptin, chymostatin, antipain, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Fura 2-AM, fluorescein and rhodamine isothiocyanate and calf adenosine deaminase (ADA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). ADA was desalted with a Sephadex G-25 column (Pharmacia) prior to all assays. Electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Barcelona, Spain). Sephadex G-25 and protein A Sepharose CL4B was from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). All other products were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

**Antibodies and fluorescent probes.** Antisera against purified calf ADA and against peptides of  $A_1$  adenosine receptor (PC10 and PC20) were generated by immunization of

female New Zealand White rabbits by Bio-Kit Company (Barcelona, Spain). Antibodies against A<sub>1</sub>R<sub>s</sub> (PC11 and PC21) were purified from serum obtained by affinity, using the respective specific peptide coupled to thiol-Sepharose 4B (Pharmacia). Anti-ADA antibody was purified using ADA coupled to cyanogen bromide activated Sepharose (Pharmacia). The specificity of antibodies for their respective antigens and an extensive characterization of anti-ADA and anti-A<sub>1</sub>R antibodies (PC11 and PC21) has been previously reported (36,37). PC11 and PC21 antibodies do not recognize ADA from DDT<sub>1</sub>MF-2 cell extracts by immunoblotting, immunoprecipitation or immunocytochemistry (34). PC21 and PC11 A<sub>1</sub>R antibodies were shown to be immunocytochemically specific for cells expressing A<sub>1</sub>R<sub>s</sub> (32).

**Cell cultures and protein determination.** DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells derived from a steroid-induced leiomyosarcome of Syrian hamster vas deferens were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Whittaker, Walkersville, NY, USA), 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5% (v/v) horse serum and 5% (v/v) fetal calf serum (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Desensitization and sequestration assays were performed with cells growing in the absence or in the presence of 0.5 U/ml ADA and/or 50 nM R-PIA. At the indicated incubation times, cells were harvested and exhaustively washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) before binding, immunocytochemistry and intracellular calcium mobilization assays.

Protein content was measured by the bicinchoninic acid method, BCA (Pierce), as described by Sorensen and Brodbeck (38).

**Radioligand binding assays.** For binding assays, untreated or treated DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (1mg/ml) were resuspended in serum-free DMEM buffered with 20 mM HEPES, pH 7.4, and preincubated with 0.5 U/ml ADA for 30 min at 4°C. Radioligand binding was performed in the presence of 5 nM of [<sup>3</sup>H]R-PIA for 4h at 4°C. Nonspecific binding was performed in the presence of 400-fold excess of R-PIA. Nonspecific binding with 500-fold excess of the selective A<sub>1</sub>R antagonist DPCPX resulted in similar displacement of [<sup>3</sup>H] R-PIA binding. After achieving the equilibrium, incubates were filtered through glass fiber filters

(Watman GF/C filters) in a Brandel cell harvester (Biomedical Research and Development Laboratories Inc, MD, USA). Filters were washed with 5 ml of ice-cold PBS and they were transferred to scintillation vials containing 10 ml of scintillation solution EcoscintH (National Diagnostics, Atlanta, Georgia). After shaking overnight, vials were counted using a Packard 1600 TRI-CARB scintillation counter with 50% efficiency. All points represent the mean of 3-5 independent experiments performed in triplicates.

**Phosphorylation assays.** A<sub>1</sub>R phosphorylation was induced by 0.5 U/ml ADA and/or 50 nM R-PIA treatment after radiolabeling the cellular ATP pool with [<sup>32</sup>P]orthophosphate. Briefly, DDT<sub>1</sub>MF-2 cells washed twice and resuspended in phosphate-free DMEM (buffered with 20 mM HEPES, pH 7.4) were incubated (10<sup>6</sup> cells/ml, 37°C, 2 h) with 0.1 mCi/ml [<sup>32</sup>P]orthophosphate. Loaded cells were resuspended (1x 10<sup>6</sup> cells/ml) in serum-free DMEM and incubated with the indicated reagents at 37°C. After the corresponding incubation times, cells were centrifugated (10 sec, 14000 rpm) in a microcentrifuge and washed twice in 1ml of ice-cold PBS before disruption and solubilization (1h at 4°C) in 0.5 ml of lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 1% (v/v) Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, pepstatin, chymostatin and antipain). The solubilized preparation (0.2 mg/ml) was immediately processed for immunoprecipitation with the anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC11, 50 µg/ml) and protein A Sepharose beads. Immunoprecipitated material was washed four times with lysis buffer (1 x 1% , 2 x 0.1% and 1 x 0% NP-40) before resuspension in 50 µl SDS sample buffer. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and autoradiography was performed as described elsewhere (37). Phosphorylated bands were quantified with a Computing Densitometer (Molecular Dynamics).

**Immunostainig and immunofluorescence assays.** For immunofluorescence staining, treated and untreated cells were washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 15 min at room temperature. After two washes in PBS containing 20 mM glycine (buffer A) and in buffer A containing 1% BSA (buffer B), cells were incubated with the rhodamine-conjugated anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC21-TRITC, 75 µg/ml) and the fluorescein-conjugated anti-ADA antibody (anti-ADA-FITC, 75 µg/ml) or, alternatively, with the

fluorescein-conjugated anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC21-FITC, 75 µg/ml) for 1h at 37°C. Three washes in buffer B were performed before mounting the samples using immunofluorescence medium (ICN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA, USA).

Internalization was analyzed by immunocytochemistry and confocal microscopy. To follow dynamic internalization, unfixed cells growing on glass coverlips were incubated (37°C, 20 min) with PC21-TRITC (10 µg/ml) and/or ADA-FITC (0.5 U/ml) alone and then treated with 50 nM R-PIA at 37 °C for 24-72 h. Cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min and washed twice again in PBS 20mM Glycine. Glass coverslips were mounted as described above. Cells were examined with a LEICA TCS 4Dconfocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope (Leica Lasertechnik GmbH, Heidelberg). Images shown are representative of at least three experiments .

Internalization measurements for cell surface ADA (ecto-ADA) were performed by immunostaining and flow cytometry analysis. Cells were grown in complete medium in the absence or the presence of 50 nM R-PIA for 0-48 h. Cells were harvested, rinsed in PBS and then fixed using 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. Cells were washed in buffer A and buffer B for 20 min before staining with anti-ADA-FITC (75 µg/ml). Three washes in buffer B were performed before analysing fluorescence intensity from 5000-10000 cells on an EPICS Profile flow cytometer (Coulter, Hialeah, FL). Similar assays were performed for cells incubated (30 min-48 h at 37°C) with 0.5 U/ml fluorescein-conjugated ADA (ADA-FITC) in the absence or presence of 50 nM R-PIA. In order to remove as much as possible of the cell surface-bound ADA, cells were washed once in PBS and once in PBS/HCl, pH 2, for 15 min according to the method of Yang et al. (39). Cells were fixed and processed for flow cytometry analysis as described above. For establishing comparisons in internalization studies the mean of fluorescence intensity taken as reference was that found in cells incubated with 0.5 U/ml ADA-FITC for 15 min at 37°C. This fluorescence intensity was similar to that found in cells incubated with 0.5 U/ml ADA-FITC at 4°C for 2 h, which it

was considered as the background signal. Increases over this fluorescence would reflect internalization of ADA-FITC.

**Measurement of intracellular free calcium.** Cells were washed and resuspended ( $5 \times 10^6$  cells/ml) in Hank's balanced salt solution (HBSS, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub> supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4) and loaded with 5 µM Fura 2-AM for 30 min at 25°C. Cells were washed twice and resuspended in HBSS buffer ( $1 \times 10^6$  cells/ml) for 20 min at room temperature. Cells were placed in a cuvette ( $10^6$  cells/2 ml of HBSS, 0.2 U/ml ADA) and calcium peak induction was achieved by treatment with 50 nM R-PIA at 30 °C. For short-term desensitization assays (1-15 min) cells were loaded and washed before resuspension in pre-warmed (37°C) serum-free DMEM ( $1 \times 10^6$  cells/ml) and incubated with the indicated reagents. Cells were washed three times with HBSS buffer to remove reagents before resuspension in the same buffer and R-PIA induction of calcium mobilization as indicated above. After these three washes [Ca<sup>2+</sup>] baseline levels were similar irrespective of the type of pretreatment. Therefore differences in calcium mobilization were not consequence of different calcium baseline levels in response to pretreatments. For long-term desensitization (12, 24 and 48 h) incubations were performed before loading with Fura 2-AM. Calcium concentration was determined in a dual-wavelength Shimadzu RF-5000 spectrofluorophotometer by using the ratio of excitation wavelengths 334/366 nm with emission cut off at 500 nm. Free calcium concentration was calculated as previously described (40).

**Statistical analysis.** Time course curves were fitted to a single-phase exponential decay equation, in the case of [<sup>3</sup>H]R-PIA binding. Statistical comparisons were made using the two-tailed Student's *t* test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

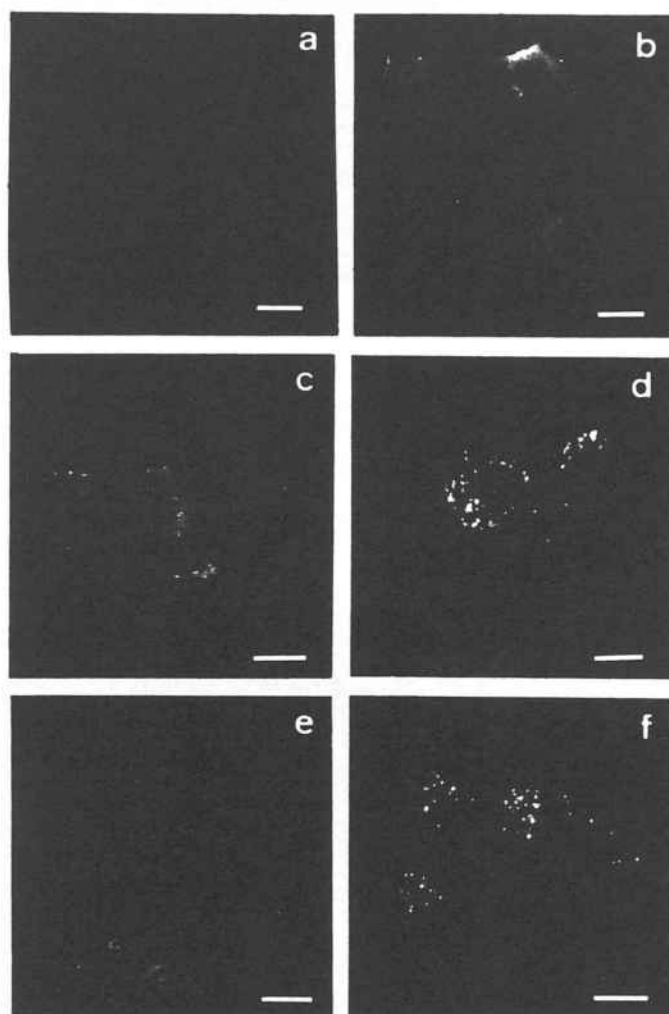
### *Effect of ADA on cell surface distribution of A<sub>1</sub>R<sub>s</sub> in the absence and in the presence of agonist.*

A<sub>1</sub> adenosine receptor (A<sub>1</sub>R) distribution on the surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells was examined by immunocytochemistry and confocal analysis. Untreated and R-PIA-treated cells were fixed, incubated with the

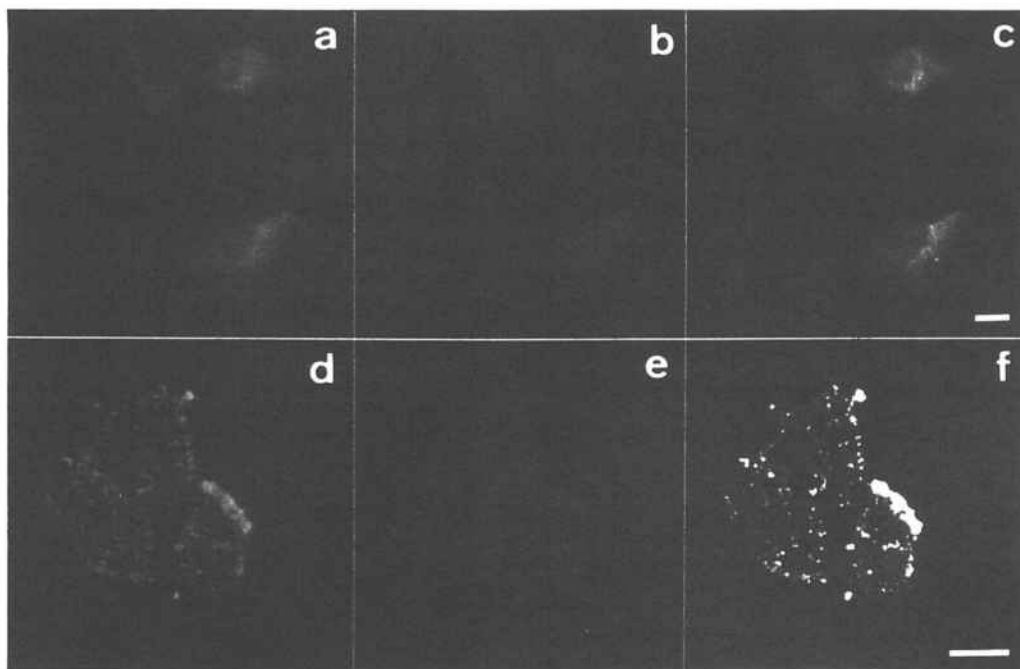
fluorescein-conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC21-FITC) and analyzed by confocal microscopy. The PC21 antibody is directed against the second extracellular loop of A<sub>1</sub>R and its specificity for cell-surface expressed A<sub>1</sub>R has been previously demonstrated (Ciruela et al., 1997). Receptor distribution in untreated cells revealed homogenous bright staining on the cell surface of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (Figure 1a). No major differences in receptor distribution was observed in presence of exogenous ADA (0.5 U/ml) for 15 min (Figure 1b). 5 min exposure of cells to the A<sub>1</sub>R agonist R-PIA (50 nM) induced the appearance of bright accumulations of antigen on the plasma membrane suggesting aggregation or clustering of receptor molecules (Figure 1c). Clustering of A<sub>1</sub>Rs was more evident after 15 min of R-PIA exposure when brighter clusters were found (compare Figures 1c and 1e). Incubation of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells with ADA and R-PIA changed dramatically the pattern of cell surface A<sub>1</sub>R distribution. In the presence of ADA, clusters of A<sub>1</sub>R were already evident at 2 min and the label was found as intense bright punctate accumulations at 5 or 15 min of R-PIA treatment (Figure 1d, f). This clearly shows the involvement of ecto-ADA on regulating the R-PIA-induced aggregation of cell surface A<sub>1</sub>R molecules. All images shown in Figure 1 represent reconstructions of multiple sections at different levels. When middle sections were analyzed only the cell surface staining was observed, thus ruling out intracellular staining (data not shown, see ref. 32).

To analyze the codistribution between A<sub>1</sub>R and ADA on the plasma membrane of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells, ADA-treated cells were incubated with or without 50 nM R-PIA for 15 min. Cells were fixed, washed and stained by double immunofluorescence using the fluorescein-conjugated anti-ADA antibody (anti-ADA-FITC) and the rhodamine-conjugated anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC21-TRITC). An homogenous distribution of ADA (Figure 2a) and A<sub>1</sub>R (Figure 2b) on the cell surface was

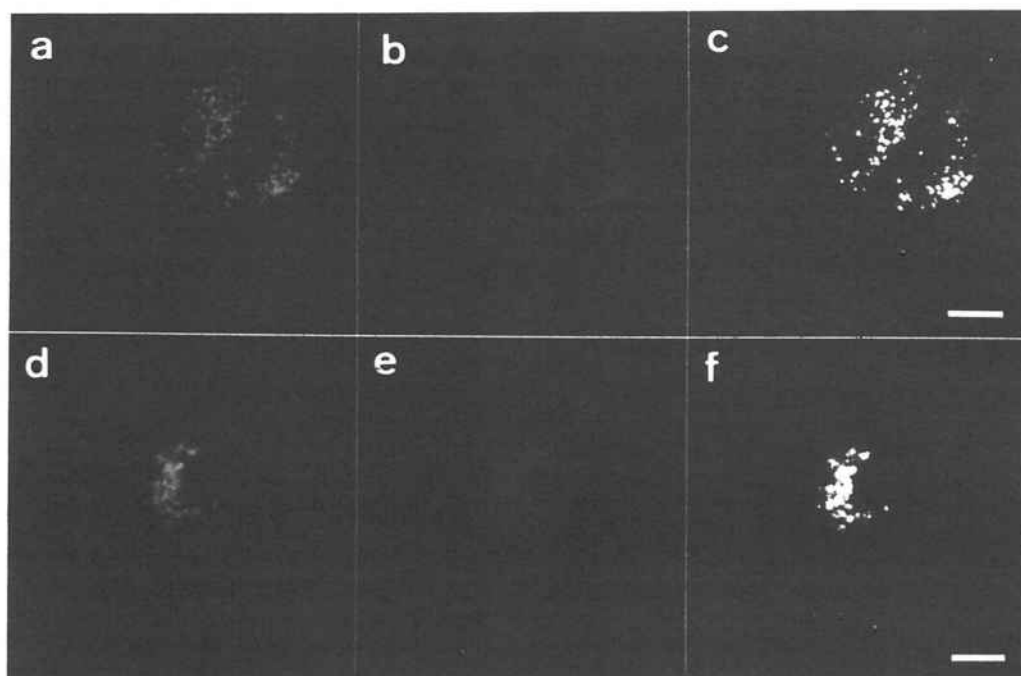
observed in untreated cells. Superimposition of images by confocal analysis showed a large colocalization (yellow color) of both proteins on the plasma membrane (Figure 2c).



**FIG. 1.** Cell surface A<sub>1</sub>R redistribution in response to adenosine deaminase and/or R-PIA. DDT<sub>1</sub>MF-2 cells were untreated (a) or treated with 0.5 U/ml ADA (b), 50 nM R-PIA (c,e) or 0.5 U/ml ADA plus 50 nM R-PIA (d,f) for 5 (c,d) or 15 min (a,b,e,f) at 37 °C. Cells were fixed, processed by immunofluorescence staining with the use of a fluorescein-conjugated anti-A<sub>1</sub>R antibody (PC21-FITC, 75 µg/ml) and observed by confocal microscopy. The images shown correspond to reconstructions of several horizontal sections of representative cells. Scale bar: 10 µm.



**FIG. 2.** Colocalization between  $A_1R$  and ADA on the cell surface. Cells were treated with 0.5 U/ml ADA in the absence (a,b,c) or presence (d,e,f) of 50 nM R-PIA for 15 min at 37 °C. After treatment, cells were washed, fixed and processed for immunostaining as described under "Experimental Procedures". Immunocytochemistry staining was performed with the fluorescein-conjugated anti-ADA antibody (anti-ADA-FITC, 75  $\mu$ g/ml) and the rhodamine-conjugated anti- $A_1R$  antibody (PC21-TRITC, 75  $\mu$ g/ml). Cells were analyzed by double immunofluorescence with a confocal microscope to detect ADA (green images; a,d) and  $A_1R$  (red images; b,e). Superimposition of images gives in yellow color (c,f) the colocalization of ADA and  $A_1R$ . Scale bar: 10  $\mu$ m.



**FIG. 8.** Colocalization of internalized ADA and  $A_1R$  in the absence or presence of R-PIA.  $DDT_1MF-2$  cells were grown in DMEM-containing fluorescein-conjugated ADA (ADA-FITC, 0.5 U/ml) and rhodamine-conjugated anti- $A_1R$  antibody (PC21-TRITC, 10  $\mu$ g/ml) in the absence (a,b,c) or in the presence of 50 nM R-PIA (d,e,f) for 24 h. After pretreatment, cells were fixed, washed and analyzed by double immunofluorescence with a confocal microscope to detect ADA (green images, a,d) and  $A_1R$  (red images, b,e). Superimposition of images (c,f) gives in yellow the intracellular colocalization of ADA and  $A_1R$ . Scale bar: 10  $\mu$ m.

When cells were treated (15 min) with R-PIA a redistribution of ADA and A<sub>1</sub>Rs, which is consistent with clustering, was observed. R-PIA induced aggregation of both proteins in clusters seen as punctate accumulations of fluorescence (Figure 2d, e) and where colocalization between A<sub>1</sub>R and ecto-ADA was very high (Figure 2f).

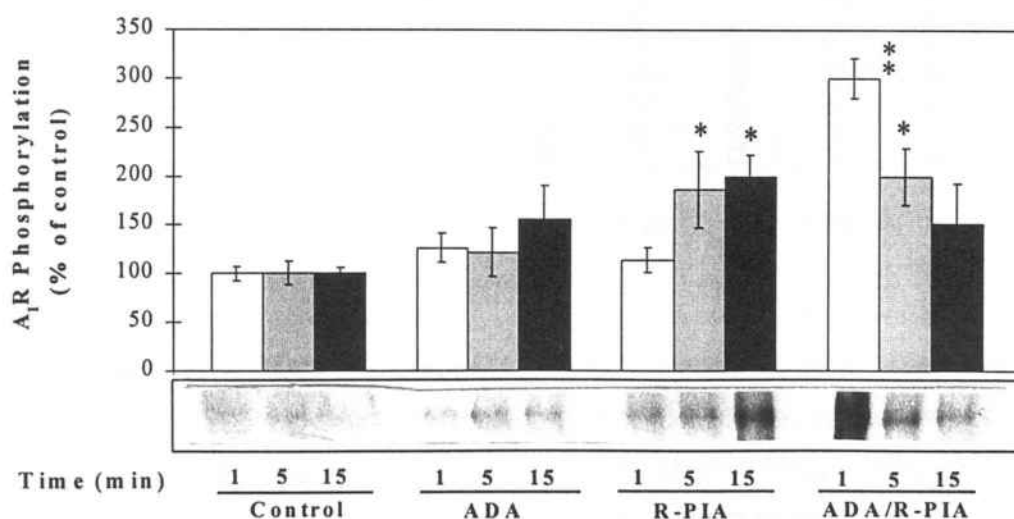
#### ADA affects ligand-induced phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs.

In a previous work, we have shown that ligand-induced phosphorylation of A<sub>1</sub>R correlates with the clustering of receptors on DDT<sub>1</sub>MF-2 cell surface (32). To determine whether the potentiation of the clustering by ADA could involve changes in the receptor phosphorylation, we immunoprecipitated the receptor from cells metabolically labeled with [<sup>32</sup>P]-orthophosphate. Exogenous ADA by itself modified only slightly the A<sub>1</sub>R phosphorylation. R-PIA (50 nM) induced, in the absence of ADA, a time-course increase of A<sub>1</sub>R phosphorylation from basal levels to a 2.1-fold increase at 15 min. Interestingly, in the presence of exogenous ADA (0.5 U/ml) R-PIA induced a rapid increase in A<sub>1</sub>R phosphorylation with a maximum rise (3-fold increase) after 1 min; thereafter (5 and 15 min) the level of

phosphorylation declined (Figure 3). In the presence of ADA receptor phosphorylation diminished to basal level after 15-30 min, whereas for cells treated with R-PIA in the absence of the enzyme the return to basal levels of phosphorylation was slower.

#### Agonist-induced desensitization of A<sub>1</sub>Rs in the presence of ADA.

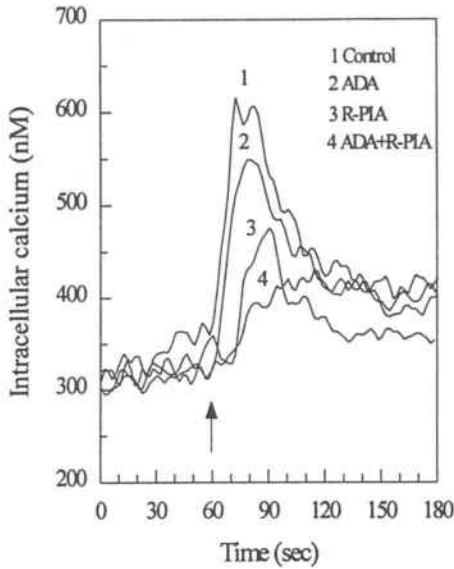
Activation of A<sub>1</sub>Rs with adenosine or analogues leads to both Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> formation and intracellular calcium mobilization in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells (41,42). To correlate changes in agonist-induced A<sub>1</sub>R phosphorylation with possible changes in second-messenger production, we analyzed the effect of ADA and/or R-PIA on agonist-induced mobilization of intracellular calcium. Cells were exposed to vehicle (control) or to 0.5 U/ml ADA and/or 50 nM R-PIA. After exhaustive washes, calcium mobilization was induced by 50 nM R-PIA. R-PIA lead to a transient Ca<sup>2+</sup> peak in naïve (vehicle-treated) cells (Figure 4a). Desensitization of the [Ca<sup>2+</sup>] response in R-PIA- or R-PIA/ADA-treated cells occurred rapidly (minutes) and was sustained for at least 48 h (Figure 4b). R-PIA pretreatment reduced the maximum intracellular calcium concentration by 2 %, 30 % and 44 % at 1, 5 and 15 min



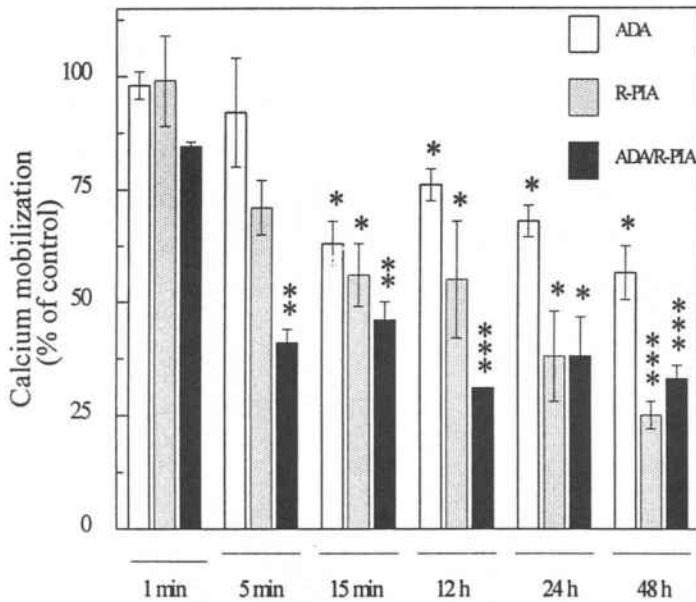
**FIG. 3.** Agonist-induced phosphorylation of A<sub>1</sub>R in the absence or presence of ADA. DDT<sub>1</sub>MF-2 cells were metabolically labelled with <sup>32</sup>Pi and stimulated by means of vehicle (control), 0.5 U/ml ADA and/or 50 nM R-PIA for 1 (white bars), 5 (grey bars) or 15 min (black bars) at 37 °C. A<sub>1</sub>R were immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE. Gels were autoradiographed and bands of phosphorylated A<sub>1</sub>R (36 kDa; representative experiment shown at the bottom) were quantitated with a Computing Densitometer. Data are expressed in percentage respect to the basal level found in control cells. Data are mean ± SEM of four separate experiments performed in duplicates. \**p* < 0.05 ; \*\**p* < 0.005 respect to the corresponding control at time 1, 5 or 15 min.



A



B



respectively. This effect was, however, potentiated in the presence of ADA since the maximum desensitization (60 %) was achieved at 5 min and maintained for up to 48 h (Figure 4a, b). No significant differences in maximum effect were observed when R-PIA pretreatment was done in the presence or in the absence of ADA (Figure 4b). It should be noted that ADA-pretreatment in the absence of

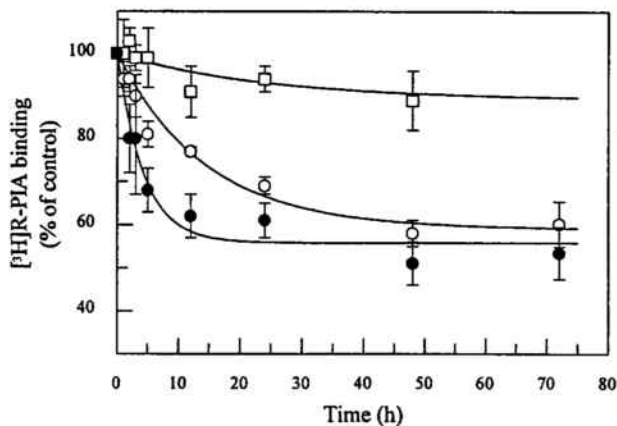
**FIG.4.** Agonist-induced functional desensitization of  $A_1R$  in the absence or presence of adenosine deaminase. Panel A. Cells were loaded with Fura 2-AM (30 min, 25 °C), resuspended in serum-free DMEM and preincubated with vehicle (control), 0.5 U/ml ADA, 50 nM R-PIA or 0.5 U/ml ADA plus 50 nM R-PIA for 5 min at 37 °C. After extensive washing, intracellular calcium mobilization was achieved by 50 nM R-PIA as described under "Experimental Procedures". Traces correspond to a representative experiment. Panel B. Time course of functional desensitization, measured as R-PIA-induced intracellular calcium mobilization, after pretreatment of cells with ADA and/or R-PIA. Intracellular calcium mobilization was achieved as described in A. For long term desensitization (12, 24 and 48 h), cells were grown in the presence of the reagents prior to the loading with Fura2-AM (see "Experimental Procedures"). Data are presented as percentage of the maximal response obtained for control cells stimulated with 50 nM R-PIA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$  respect to the untreated cells.

R-PIA led to a significant and sustained desensitization (25-45 % reduction of the response).

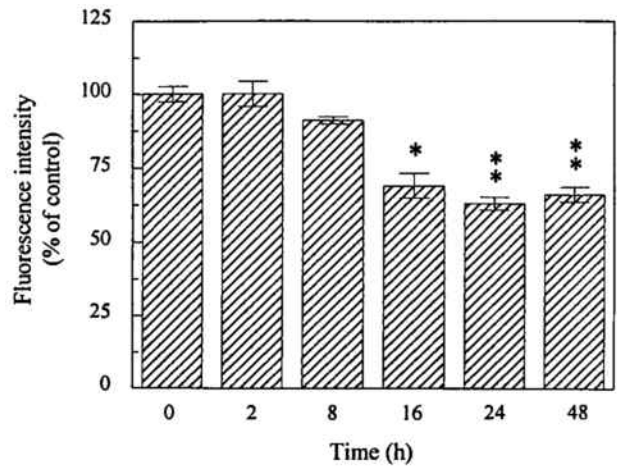
#### Loss of [ $^3H$ ]R-PIA binding sites.

Characterization of  $A_1R$ s by radioligand binding using the agonist [ $^3H$ ]R-PIA indicated the presence of two affinity states of the receptors ( $K_{high} = 0.8-2$  nM and  $K_{low} = 10-100$  nM) in cell membrane preparations

whereas in intact cells it was only possible to detect the low affinity state (43). Ligand binding assays were performed in intact cells preincubated with vehicle (control), or with 50 nM R-PIA and/or 0.5 U/ml ADA. Cells were extensively washed and assayed for [<sup>3</sup>H]R-PIA binding at 4°C. The results obtained indicated a time-dependent loss of binding sites on the cell membrane of treated cells (Figure 5). The loss of binding sites after incubation of cells with ADA in the absence of R-PIA was small. In contrast, preincubation of cells with 50 nM R-PIA with or without ADA resulted in a time-dependent reduction of [<sup>3</sup>H]R-PIA binding sites. The presence of ADA accelerated the reduction of binding sites, from  $t_{1/2} = 10 \pm 1$  h in the absence of ADA to  $t_{1/2} = 2.9 \pm 0.5$  h in the presence of ADA. The maximum loss of membrane binding sites (around 41 %) induced by agonist was not modified by the presence of ADA (Figure 5).



**FIG. 5.** [<sup>3</sup>H]R-PIA binding to cells in response to ADA and/or R-PIA treatment. Cells were incubated with vehicle (control), 0.5 U/ml ADA (□), 50 nM R-PIA (○) or 0.5 U/ml ADA plus 50 nM R-PIA (●) for the indicated time at 37 °C. After pretreatment, cells were washed and incubated for 4h at 4°C with 5 nM [<sup>3</sup>H]R-PIA. Data are presented as percentage of the specific binding respect to untreated cells. Data are mean ± SEM of five experiments performed in quadruplicates.



**FIG. 6.** Cell surface expression of ecto-ADA in response to R-PIA. Cells were untreated (control) or treated with 50 nM R-PIA for 0-48 h at 37 °C. After the treatment, cells were washed once in PBS, fixed using 4% paraformaldehyde in PBS and prepared for immunostaining with the fluorescein-conjugated anti-ADA antibody (ADA-FITC, 75 µg/ml) as indicated under "Experimental Procedures". Fluorescence intensity was quantified on a EPICS Profile flow cytometer. Data are presented as percentage respect to untreated cells. Values represent the mean ± SEM from three separate experiments performed in triplicates. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

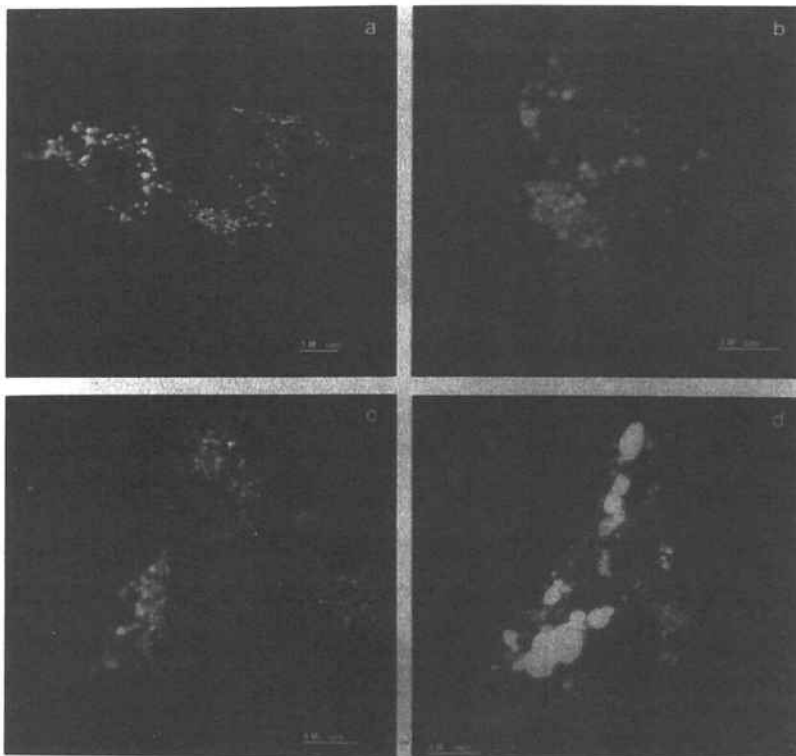
#### Internalization of A<sub>1</sub>Rs together with ADA.

In order to determine whether agonist-induced disappearance of binding sites affects the expression of cell surface ADA (ecto-ADA), fluorocytometry analysis was performed using nonpermeabilized cells. After pretreatment with medium (control) or 50 nM R-PIA, cells were fixed and ecto-ADA was labelled using the anti-ADA-FITC antibody. A significant time-dependent decrease in fluorescence intensity was observed after 8 h of R-PIA treatment and a maximum decrease (40%) was obtained at 24 h of R-PIA treatment, which suggest an A<sub>1</sub>R agonist-induced internalization of ecto-ADA (Figure 6).

To follow ADA internalization, cells were labelled with ADA-FITC, which binds to cell surface A<sub>1</sub>Rs (34). The labelling was performed in the presence or in the

absence of 50 nM R-PIA. After extensive washes with acid buffer, cells fixed in paraformaldehyde were analysed by flow cytometry. The acid wash was necessary to remove ADA-FITC remaining on the cell surface; therefore, quantification of incorporated fluorescence is a direct measure of internalized ADA (see Experimental Procedures). A time-dependent and progressive incorporation of fluorescence into the cells, in the period 2-48 h, was observed in the absence of R-PIA. Maximal incorporation of ADA-FITC, which occurred at 48 h, was increased (37 %) in the presence of R-PIA. The differences between control and R-PIA-treated cells were significant between 8 and 48 h. Internalization of exogenous ADA-FITC into the cells was also analyzed by immunofluorescence and confocal assays. Cells maintained in the presence of ADA-FITC for 24-72 h exhibited accumulations of labeling in intracellular vesicles. R-PIA-treatment for 24-72 h resulted in a marked increase of intracellular labeling occurring in brighter and larger intracellular vesicles

(Figure 7). Due to the fact that cell surface ADA and A<sub>1</sub>R colocalize, the results above described suggest that R-PIA might induce internalization of A<sub>1</sub>R together with ADA. We tested this hypothesis by comparing the distribution of A<sub>1</sub>Rs and ADA in double immunofluorescence staining experiments analyzed by confocal microscopy. Double immunofluorescence staining with the fluorescein- conjugated rabbit anti-A<sub>1</sub>R (PC21-FITC) and rhodamine-conjugated ADA (ADA-TRITC) were performed in control and R-PIA treated cells. Incubation of cells with ADA-FITC and PC21-TRITIC for 24 h showed staining for ADA (Figure 8a, green) and A<sub>1</sub>R (Figure 8b, red) in intracellular vesicles. Superimposition of images provides in yellow color the degree of colocalization between the two proteins, which was very high (Figure 8c). After 24 h of chronic exposure to 50 nM R-PIA a perinuclear staining and a marked decrease in the number of intracellular vesicles containing ADA (Figure 8d) and A<sub>1</sub>Rs (Figure 8e) accompanied by a drastic increase in size and brightness



**FIG. 7.** Internalization of fluorescein-conjugated ADA (ADA-FITC) in the absence or presence of R-PIA. Cells growing on glass coverslips in the presence of 0.5 U/ml ADA-FITC were incubated (37 °C) in the absence (a,c) or presence (b,d) of 50 nM R-PIA for 24 (a,b) or 72 h (c,d). Glass coverslips were washed with PBS, fixed, mounted and analyzed by confocal microscopy as described under "Experimental Procedures". Images correspond to a middle section of representative cells. Scale bar: 10  $\mu$ m.

were observed. Colocalization of both proteins (Figure 8f) was confirmed in numerous cells analyzed at various planes indicating that A<sub>1</sub>Rs and ADA are internalized together using the same endocytic pathway.

### DISCUSSION

This study provides new insights into ligand-mediated mechanisms implicated in the regulation and trafficking of A<sub>1</sub> adenosine receptors. Several studies reported in the past years have demonstrated agonist desensitization in terms of reduced inhibition of adenylate cyclase associated with a net loss of binding sites and G<sub>i</sub> proteins (29,30,31). However, little was known about the biochemical mechanisms involved in desensitization and down-regulation and about the intracellular pathways involved in the trafficking of A<sub>1</sub>Rs. Another interesting question concerns the role of ecto-ADA on the desensitization of A<sub>1</sub>R due to the fact that A<sub>1</sub>R and ADA interact on the cell surface (34). The high expression (100,000 receptors/cell) of A<sub>1</sub>Rs (43), capable of interacting with ADA (34) makes DDT<sub>1</sub>MF-2 cells a suitable model to study the role played by adenosine deaminase in the regulation of A<sub>1</sub>Rs.

By means of immunofluorescence staining using antibodies against A<sub>1</sub>R and ADA a nearly homogenous distribution of A<sub>1</sub>R and ADA over the plasma membrane of DDT<sub>1</sub>MF-2 cells was observed. Confocal analysis demonstrated a high degree of colocalization between ADA and A<sub>1</sub>R, which was maintained in the cell surface clusters formed after R-PIA treatment. The appearance of clusters was accelerated when cells were incubated simultaneously with R-PIA and ADA. This suggests an ADA-mediated regulation of ligand-induced redistribution of A<sub>1</sub>Rs. Prolonged agonist stimulation induced the disappearance of membrane A<sub>1</sub>R binding sites on DDT<sub>1</sub>MF-2 cell surface, as previously shown (29). This phenomenon was also accelerated in the

presence of ADA although the maximum effect was the same than that achieved by R-PIA alone.

Ecto-ADA also suffered a R-PIA-induced internalization process. Internalized ADA appeared in relatively small intracellular vesicles where it colocalized with A<sub>1</sub>R. This may be an agonist-independent process representing the natural recycling of the ecto-enzyme or it may be due to the presence of endogenous adenosine. This latter possibility seems unlikely since no internalization of A<sub>1</sub>R occurred in the absence of R-PIA. Although ADA internalization may be an agonist-independent process, long-term agonist treatment increased the degree of ADA internalization. Double immunofluorescence assays analyzed by confocal microscopy showed colocalization of ADA and A<sub>1</sub>Rs in the same intracellular vesicles. All these findings allow us to suggest that ADA and A<sub>1</sub>Rs participate in the regulation of each other and that this mutual regulation includes internalization via the same endocytic pathway. To our knowledge this is the first report describing the trafficking for a purine ecto-enzyme and demonstrating a common internalization pathway for A<sub>1</sub>R and the ecto-protein (ecto-ADA) interacting with it.

During the agonist-mediated redistribution (clustering) of A<sub>1</sub>Rs on the cell surface, a time-dependent phosphorylation of A<sub>1</sub>Rs occurs. Basal A<sub>1</sub>R phosphorylation increased rapidly between 5 and 15 min as consequence of agonist stimulation. In the presence of exogenous ADA, agonist-induced A<sub>1</sub>R phosphorylation was accelerated and increased. Taking into account these data and the fact that ADA increased ligand-induced A<sub>1</sub>R aggregation, the implication of phosphorylation processes on the aggregation of A<sub>1</sub> receptors is highly probable. In fact, clustering and internalization of A<sub>1</sub>Rs were mimicked by activators of PKA and PKC (32), thus evidencing the need for Ser/Thr phosphorylation in these events. Simultaneous

to ligand-induced receptor phosphorylation and aggregation a decrease of ligand-induced second messenger response, termed functional desensitization, was observed. Functional desensitization was a rapid time-dependent process occurring within minutes but it remained for hours. This contrasts with data found in Chinese hamster ovary cells transfected with the human  $A_1R$ . Overexpressed  $A_1R$  were neither phosphorylated nor desensitized after 10 min of R-PIA treatment. Interestingly a stably expressed chimeric  $A_1$ - $A_3$  adenosine receptor, in which the C-terminal domain of  $A_1R$  distal to its predicted palmitoylation site was replaced by the corresponding region of the  $A_3$  subtype, was able to undergo functional desensitization and agonist-stimulated phosphorylation (44). Differences in amino acid sequence of the C-terminal domain of  $A_1R$  and  $A_3R$  can account for the distinct desensitization pathways found in CHO cells. However, the short-term desensitization and phosphorylation here reported for  $A_1R$  in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells demonstrate that the cellular environment (likely, the composition of the cell membrane and the signalling pathways) has a relevant role in receptor regulation. The regulation of  $A_1R$  phosphorylation and desensitization by cell surface ADA is an example of the relevance of the membrane components for receptor regulation. To our knowledge this is a novel finding since no other receptor whose function is modulated by an ectoenzyme has been described.

Ligand-induced rapid desensitization of G-protein coupled receptors such as  $\beta_2ARs$  (45), angiotensin II receptor (46), cholecystokinin receptor (47),  $\delta$ -opioid receptor (48) and neurokinin<sub>1</sub> receptor (49) correlates with receptor phosphorylation and uncoupling from G proteins. Several works have provided evidence that receptor desensitization is a short-term process that does not require endocytosis (45,50,51). An exception is the agonist-induced desensitization of the secretin receptor

which occurs in the absence of receptor phosphorylation and it is basically induced by receptor internalization (52).  $\beta_2ARs$  (22,23) and neurokinin<sub>1</sub> receptor (49) resensitization seems to be consequence of receptor dephosphorylation in endosomes and their recycling back to the plasma membrane. Our data indicate that despite receptor phosphorylation returns to its basal level desensitization of  $A_1R$  continued for hours (see figure 3 and 4). In a recent study, desensitization of the cholecystokinin receptor occurred in both rat pancreatic acinar cells and transfected Chinese hamster ovary (CHO) cells despite receptor dephosphorylation was only evident in acinar cells. Moreover, cholecystokinin receptor in CHO cells maintained its phosphorylation state through the time of internalization, whereas the acinar cell receptor was dephosphorylated to its basal state while remaining on the cell surface (47). All these data suggest differences in regulation of GPCRs depending on the receptor subtype and the cell system where the receptor is expressed.

The results presented provide new insights about the regulation and trafficking of  $A_1Rs$  in response to agonist stimulation. Moreover, it is shown that ecto-ADA, besides its role in regulating the extracellular concentration of adenosine, modulates all the regulatory mechanisms involved in desensitization of  $A_1R$ . It is remarkable that ADA and  $A_1R$  colocalize on the cell surface and in intracellular vesicles after internalization. During the agonist-dependent internalization process ADA and  $A_1R$  follow a common endocytic pathway. This is probably the molecular mechanism underlying the recent discovery of increased plasma adenosine levels found after caffeine or sulphophenylteophylline consumption (53). Despite it does not occur in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells, there are cell types whose  $A_1Rs$  internalize in response to xanthine antagonists (data in preparation). The probable internalization of ADA and  $A_1R$  from the cell surface in those cells would lead to a

decrease in adenosine deamination and subsequently, to an increase in the extracellular levels of the nucleoside. As pointed out by Conlay et al. (53), alteration of adenosine levels by sudden changes in methylxantine consumption could affect the physiology of many organ systems and provoke bronchospasm, alter blood pressure, change cardiac rhythms, or influence seizure thresholds. Confirmation that internalization of ecto-ADA is the cause of these alterations would be very valuable from a physiological and therapeutic point of view.

*Acknowledgments.*-This work was supported by a joint (Echevarne Foundation and Spanish Ministry of Education) PETRI Grant (PTR92/0047) administered by Fundació Bosch i Gimpera and by Grants from *Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social* (nos. 87/1389 and 91/0272), from CIRIT-CICYT (QFN93/4423) and from CICYT (SAF97/0066). We thank Catalina Relafio (Servei de Cultius Celulars) and Susana Castel and Jaume Comas (Servei Científic-Tècnics) for their excellent technical assistance. We thank Biokit for their help in the development of anti-ADA and anti-A<sub>2</sub>R antibodies used in our studies.

## REFERENCES

- Palmer, T. M., and Stiles, G. L. (1995) *Neuropharmacol.* **34**, 683-694.
- Fredholm, B. B. and Dunwiddie, T. V. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 130-134.
- Fredholm, B. B. (1995) *Pharmacol. Toxicol.* **76**, 228-239.
- Belardinelli, L. (1993) *Drug Develop. Res.* **28**, 263-267.
- Spielman, W. S. and Arend, L. J. (1991) *Hypertension.* **17**, 117-130.
- Elhashim, A., Dagostino, B., Matera, M. G. and Page, C. (1996) *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1262-1268.
- Nyce, J. W. and Metzger, W. J. (1997) *Nature.* **385**, 721-725.
- Munshi, R., Pang, I.-H., Sternweis, P. C. and Linden, J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22285-22289.
- Jockers, R., Linder, M. E., Hohenegger, M., Nanoff, C., Bertin, B., Strosberg, A. D., Marullo, S. and Freissmuth, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32077-32084.
- Figler, R. A., Graber, S. G., Lindorfer, M. A., Yasuda, H., Linden, J. and Garrison, J. C. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 1587-1595.
- Londos, C., Cooper, D. M. F. and Wolff, T. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 2551-2554.
- Lohse, M. J., Lenschow, V. and Swabe, U. (1984) *Mol. Pharmacol.* **26**, 1-9.
- Casadó, V., Canti, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C. and Franco, R. (1990) *J. Neurosci. Res.* **26**, 461-473.
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Mallol, J., Lluís, C. and Canela, E.I. (1996) *Biochemistry.* **35**, 3007-3015
- Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C. and Franco, R. (1991) *FEBS Lett.* **286**, 221-224.
- Premont, R. T., Inglese, J., and Lefkowitz, R. J. (1995) *FASEB J.* **9**, 175-182.
- Post, S. R., Aguila-Buhain, O., and Insel, P. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 895-900.
- Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990) *Science.* **248**, 1547-1550.
- Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, T. M., Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17882-17890.
- Fergusson, S. S. G., Downey III, W. E., Colapietro, A.-M., Barak, L. S. Ménard, L. and Caron, M. G. (1996) *Science.* **271**, 363-366.
- Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996) *Nature.* **383**, 447-450.
- Pippig, S., Andexinger, S. and Lohse, M. J. (1995) *Mol. Pharmacol.* **47**, 666-676.
- Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5-8.
- Dennis, D. M., Shryock, J. C. and Belardinelli, L. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 1024-1035.
- Longabaugh, J. P., Didsbury, J., Spiegel, A. and Stiles, G. L. (1989) *Mol. Pharmacol.* **36**, 681-688.
- Lee, H. T., Thompson, C. I., Hernandez, A., Lewy J. L., Belloni, F. L. (1993) *Am. J. Physiol.* **265**, H1916-1927.
- Fernandez, M., Svenningsson, P. and Fredholm, B. B. (1996) *Life Sci.* **9**, 769-776.
- Ruiz, A., Sanz, J. M., Gonzalez-Calero, G., Fernández, M., Andrés, A., Cubero, A. and Ros, M. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* **1310**, 168-174.

29. Ramkumar, V., Olah, M. E., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1991) *Mol. Pharmacol.* **40**, 639-647.
30. Green, A., Johnson, J. L., and Milligan, G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5206-5210.
31. Green, A., Milligan, G. and Dobias, S. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3223-3229.
32. Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1997). In press
33. Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I. and Lluís C. (1997) *Prog. Neurobiol.* **52**, 283-294.
34. Ciruela, F., Saura, C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (1996) *FEBS Lett.* **380**, 219-223.
35. Saura, C., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (1996) *J. Neurochem.* **66**, 675-682.
36. Aran, J. M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, J. L. and Franco, R. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001-1007.
37. Ciruela, F., Casadó, V., Mallol J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1995) *J. Neurosci. Res.* **42**, 818-829.
38. Sorensen, K., and Brodbeck, U. (1986) *Experientia.* **42**, 161-162.
39. Yang E-B., Wang, D-F, Mack, P., and Cheng L-Y. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **224**, 309-317.
40. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
41. Gerwins, P., and Fredholm, B. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16081-16087.
42. Dickenson, J. M. and Hill, S. J. (1993) *Br. J. Pharmacol.* **108**, 85-92.
43. Gerwins, P., Nordstedt, C., and Fredholm, B. B. (1990) *Mol. Pharmacol.* **38**, 660-666.
44. Palmer, T. M., Benovic, J. L. and Stiles, G. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15272-15278.
45. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G., and Lefkowitz, R. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 3202-3209.
46. Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W., and Lefkowitz, R. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 13266-13272.
47. Rao, R. V., Roettger, B. F., Hadac, E. M., and Miller, L. J. (1997) *Mol. Pharmacol.* **51**, 185-192.
48. Pei, G., Kieffer, B. L., Lefkowitz, R. J., and Freedman, N. J. (1995) *Mol. Pharmacol.* **48**, 173-177.
49. Garland, A. M., Grady, E. F., Lovett, M., Vigna, S. R., Frucht, M. M., Krause, J. E., and Bunnett, N. W. (1996) *Mol. Pharmacol.* **49**, 438-446.
50. Yu, S. S., Lefkowitz, R. J., and Hausdorff, W. P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 337-341.
51. Sanders, M. A., and LeVine III, H. (1996) *J. Neurochem.* **67**, 2362-2372.
52. Holtmann, M. H., Roettger, B.F., Pinon, D. I., and Miller, L. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23566-23571.
53. Conlay, L. A., Conant, J. A., deBros, F., and Wurtman, R. (1997) *Nature.* **389**, 136.

## 4. DISCUSIÓN



## 4. DISCUSIÓN

La adenosina ejerce numerosos efectos fisiológicos en la mayoría de tejidos del organismo a través de la activación de sus receptores específicos de membrana. Cuatro receptores de adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ), pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, han sido clonados hasta el momento (Olah and Stiles, 1995; Palmer and Stiles, 1995). El receptor  $A_1$  de adenosina se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, aunque se expresa de forma abundante en cerebro y testículo. En el sistema nervioso central, las zonas que presentan mayor expresión son la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el tálamo y el estriado (Bruns et al., 1987; Magan et al., 1991). En el sistema nervioso la adenosina, a través de los receptores  $A_1$ , actúa como modulador de la transmisión sináptica a través de la inhibición de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, la dopamina, la noradrenalina, la serotonina, el aspartato y el glutamato (Fredholm and Dunwiddie, 1988).

En los primeros estudios de caracterización del receptor  $A_1$  de adenosina en membranas de cerebro de rata mediante unión de agonistas específicos de este receptor, se puso de manifiesto la existencia de dos estados de afinidad (baja y alta afinidad) del receptor (Williams and Risley, 1980), que clásicamente se atribuían al receptor desacoplado de la proteína G (baja afinidad,  $K_d = 1-5$  nM) y al complejo receptor-proteína G (alta afinidad,  $K_d = 0.1-0.5$  nM) (Lohse et al., 1984; Casadó et al., 1990b). Según el modelo de cooperatividad negativa formulado por nuestro grupo de investigación (Franco et al., 1996), el estado de alta y baja afinidad son consecuencia de la cooperatividad negativa de la unión del agonista al receptor y no estarían, en principio, relacionados con la cantidad de receptores libres o acoplados a la proteína G. Según este modelo, el ligando agonista a altas concentraciones induce una transformación del complejo receptor-proteína G del estado de alta al de baja afinidad (Casadó et al., 1991; Franco et al., 1996). Todos los modelos cinéticos formulados para el receptor  $A_1$  de adenosina se basan en experimentos de unión de radioligandos a membranas de células o tejidos. En todos estos experimentos se adiciona adenosina desaminasa (ADA) al medio de incubación ya que en estas condiciones se observa un aumento de la unión de ligandos a las membranas. Por ejemplo, Bruns et al. (1980) sólo detectaban la unión del agonista [ $^3$ H]CHA a membranas de cerebro de cerdo cuando se incuban éstas con ADA. Además, la inhibición de la enzima con el potente inhibidor irreversible (8*R*)desoxicoformicina (R-DCF) o con EHNA reducían un 75 % la unión del

radioligando. Análogamente, en membranas de cerebro de rata, la unión del agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA al receptor A<sub>1</sub> se incrementaba tres veces tras la incubación previa de las membranas con ADA (Schwabe and Trost, 1980). La explicación que se ha dado a estos hechos es que la presencia de adenosina endógena en el medio de incubación compite con los radioligandos de manera que disminuye la unión de los agonistas al receptor A<sub>1</sub>. En estas preparaciones, la adenosina endógena podría estar atrapada en vesículas (Schiemann et al., 1990; Prater et al., 1992) o proceder de la metabolización de nucleótidos de adenina (Linden, 1989). La presencia de ADA sería necesaria para transformar la adenosina endógena en inosina, la cual no interacciona con los receptores de adenosina.

En esta Tesis Doctoral se ha analizado la unión del agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA y del antagonista [<sup>3</sup>H]DPCPX al receptor A<sub>1</sub> de adenosina en membranas de corteza cerebral de cerdo y, como era de esperar, la unión de ambos ligandos depende de la presencia de ADA. La ADA incrementa de forma dosis dependiente la unión del agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA (EC<sub>50</sub> = 0.67 mU/ml) y la del antagonista [<sup>3</sup>H]DPCPX (EC<sub>50</sub> = 1.51 mU/ml). En ausencia de ADA únicamente se observa un estado de baja afinidad para el agonista (K<sub>d</sub> = 4.1 nM), mientras que la presencia de ADA provoca la conversión de un 37 % de los estados de baja en estados de alta afinidad (K<sub>d</sub> = 0.22 nM). El número máximo de sitios de unión (B<sub>max</sub>) del agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA al receptor A<sub>1</sub> no se modifica por la presencia de ADA. Al realizar el mismo tipo de estudio en células derivadas de musculatura lisa de vaso deferente de hamster DDT<sub>1</sub>MF-2 se obtienen resultados similares. Esta línea celular expresa endógenamente ecto-ADA (≈ 1mU/10<sup>6</sup> células) y una alta densidad de receptores A<sub>1</sub> (100,000 receptores/célula) con unos parámetros termodinámicos de unión para la [<sup>3</sup>H]R-PIA muy parecidos a los hallados en corteza cerebral. En ausencia de ADA, el receptor A<sub>1</sub> en las células DDT<sub>1</sub>MF-2 presenta un único estado de muy baja afinidad (K<sub>d</sub> = 40 nM) por el agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA. En presencia de ADA exógena, la afinidad del receptor A<sub>1</sub> por el agonista aumenta significativamente (K<sub>d</sub> = 10 nM). Por otro lado, en preparaciones de membranas de estas células, la ADA induce la conversión del estado de muy baja afinidad (K<sub>d</sub> = 50 nM) del receptor por el agonista en dos estados, uno de alta (K<sub>d</sub> = 0.8 nM) y otro de baja afinidad (K<sub>d</sub> = 8.7 nM). En este sistema también la capacidad máxima de unión, en presencia y ausencia de ADA, no se modifica. Las alteraciones cinéticas provocadas por la ADA en los dos sistemas estudiados no pueden ser explicadas por la degradación de adenosina endógena, ya que, por un lado, la concentración de adenosina en preparaciones de membranas de corteza cerebral de cerdo o células DDT<sub>1</sub>MF-2 es muy baja (25-40 nM) y, por otro, el valor de las IC<sub>50</sub> de la adenosina como

desplazante de la [<sup>3</sup>H]R-PIA (1 nM) en membranas de células DDT<sub>1</sub>MF-2, en presencia de ADA inhibida con Hg<sup>2+</sup>, son muy altas: 129 μM (alta afinidad) y 2.7 mM (baja afinidad). Todo ello sugiere que la acción de la ADA no es únicamente debida a la degradación de adenosina.

Para confirmar que la ADA actúa independientemente de su actividad catalítica, se realizaron experimentos de unión de [<sup>3</sup>H]R-PIA en presencia de ADA enzimáticamente activa o inhibida con Hg<sup>2+</sup>. El incremento en la unión de la [<sup>3</sup>H]R-PIA a las membranas de corteza cerebral de cerdo o de células DDT<sub>1</sub>MF-2 es evidente tanto con ADA enzimáticamente activa, como con la enzima inhibida con Hg<sup>2+</sup>. Además, en presencia de ADA inhibida con Hg<sup>2+</sup>, es posible detectar, en ambos casos, los dos estados de afinidad del receptor A<sub>1</sub> con parámetros cinéticos no significativamente diferentes a los obtenidos con ADA activa. Estos datos permiten concluir que el aumento de afinidad inducido por la ADA, independientemente de su actividad catalítica, es el responsable del aumento de unión de los agonistas al receptor A<sub>1</sub>. Por lo tanto, parece evidente que debe establecerse alguna interacción a nivel molecular entre el receptor A<sub>1</sub> y la adenosina desaminasa. Con la finalidad de estudiar si la ADA y el receptor A<sub>1</sub> interactúan en membranas de corteza cerebral y en células DDT<sub>1</sub>MF-2, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación con dos anticuerpos anti-peptídicos anti-receptor A<sub>1</sub>, el PC11 y el PC21, previamente desarrollados en nuestro laboratorio (Ciruela et al., 1995). La inmunoprecipitación del receptor A<sub>1</sub> de extractos solubles de membranas de corteza cerebral y de células DDT<sub>1</sub>MF-2 provocó la coimmunoprecipitación de una proteína de peso molecular 44 kDa correspondiente a la ADA, lo que constituye la primera evidencia de que la ADA se une al receptor A<sub>1</sub> de adenosina. Por otro lado, al pasar un extracto soluble del receptor A<sub>1</sub> a través de una columna de afinidad de ADA-Sepharosa, más del 60 % del receptor se retiene en la columna, mientras que no se observa retención de lactato deshidrogenasa, proteína utilizada como control. Este resultado constituye otra evidencia de que estas dos proteínas, al menos *in vitro*, son capaces de interactuar.

Por otro lado, la interacción entre el receptor A<sub>1</sub> de adenosina y la ADA, depende de la conformación que adopte la enzima. Como se ha discutido anteriormente, la enzima activa o inhibida con Hg<sup>2+</sup> son capaces de modificar las propiedades cinéticas del receptor; sin embargo, la unión del agonista [<sup>3</sup>H]R-PIA al receptor A<sub>1</sub> no se modifica en ausencia de ADA o en presencia de la enzima inhibida con desoxicoformicina (R-DCF). Además, cuando se realizan experimentos de coimmunoprecipitación en presencia de ADA inhibida con Hg<sup>2+</sup> o R-DCF, únicamente la inhibición con Hg<sup>2+</sup> permite la inmunoprecipitación de la ADA y el receptor,

mientras que la R-DCF impide la coimmunoprecipitación de los complejos receptor  $A_1$ /ADA. La inhibición de la ADA con  $Hg^{2+}$  o R-DCF suponen variaciones estructurales de la proteína muy distintas. El  $Hg^{2+}$  reacciona con grupos sulfhidrilos necesarios para la actividad enzimática de la ADA sin modificar, de forma patente, la conformación de la enzima. Por el contrario, el análogo de la adenosina R-DCF es un inhibidor irreversible de la ADA, que estabiliza a la enzima en el estado de transición (Marrone et al., 1996). El cambio conformacional inducido por este inhibidor sobre la ADA es crítico para su interacción con el receptor  $A_1$  en la membrana.

Una vez establecido que la ADA se une al receptor  $A_1$  de adenosina, era lógico cuestionarse si esta asociación tiene lugar *in vivo* y cual es su función. El marcaje mediante inmunocitoquímica de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 con los anticuerpos antireceptor  $A_1$  (PC21) y anti-ADA puso de manifiesto la presencia de ambas proteínas en la membrana celular. El posterior análisis mediante microscopía confocal demostró un alto grado de colocación entre la ADA y el receptor  $A_1$  en la superficie de esas células. Este hecho podría indicar que el receptor  $A_1$  de adenosina (proteína de transmembrana) puede estar actuando como proteína de unión de ecto-ADA a la membrana. Hasta este momento sólo se conocía una proteína de membrana capaz de unir ecto-ADA a la membrana plasmática. A mediados de los años setenta se observó que la adenosina desaminasa interaccionaba con un dímero proteico de 200 kDa denominado originalmente como *ADA binding protein* (Van der Weyden and Kelley, 1976). Andy y Kornfeld (1982) demostraron en fibroblastos humanos que la *ADA binding protein* era una proteína integral de membrana. Años más tarde, Kameoka et al. (1993) demostraron, mediante técnicas de coimmunoprecipitación y citometría de flujo, que el antígeno de diferenciación linfocitario CD26, previamente identificado como dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) (Ulmer et al., 1990), era capaz de unir ADA a la membrana. La interacción ADA-CD26 se produce en la mayoría de especies con algunas excepciones, entre ellas las células de ratón. En esta especie el CD26 no une ADA murina o de otras procedencias, y la ADA murina no se une al CD26 murino o de otras procedencias (Dinjens et al., 1989; Schrader et al., 1990). De acuerdo con estos resultados, el marcaje inmunocitoquímico con los anticuerpos anti-CD26 y anti-ADA permite observar una baja colocación entre el CD26 y la ADA en la superficie de las células DDT<sub>1</sub>MF-2. Este hecho sugiere que, en estas células, la ADA no se une al CD26 y que la mayoría de moléculas de ecto-ADA colocan con el receptor  $A_1$ , por lo que éste actúa como receptor de la ecto-ADA. Este hecho se confirmó cuando al añadir ADA exógena en el medio de

incubación el grado de colocalización entre ambas proteínas en la membrana celular fue, prácticamente, total.

Con el objetivo de estudiar si la unión de la ADA y el receptor  $A_1$  podía modular funcionalmente a éste se eligió como modelo de estudio la línea celular DDT<sub>1</sub>MF-2. En estas células la activación del receptor  $A_1$  con agonistas induce la disminución de AMP<sub>c</sub> y aumentos en los niveles de IP<sub>3</sub> y de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (Gerwins et al., 1990; Gerwins and Fredholm, 1992; Dickenson and Hill, 1993). La acumulación de inositoles fosfato (IP<sub>3</sub>) y la movilización de Ca<sup>2+</sup> de reservorios intracelulares en respuesta al agonista, únicamente es evidente cuando la ADA está presente en el medio de incubación. En ausencia de ADA, la R-PIA prácticamente no modifica los niveles de inositoles fosfatos y Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, mientras que únicamente en presencia de la enzima se producen aumentos significativos (4 veces) de estos metabolitos. El efecto de la ADA es independiente de la actividad catalítica de la enzima, ya que, la inhibición de la ADA con Hg<sup>2+</sup> no modifica la potenciación de ésta en la producción de segundos mensajeros a través del receptor  $A_1$ .

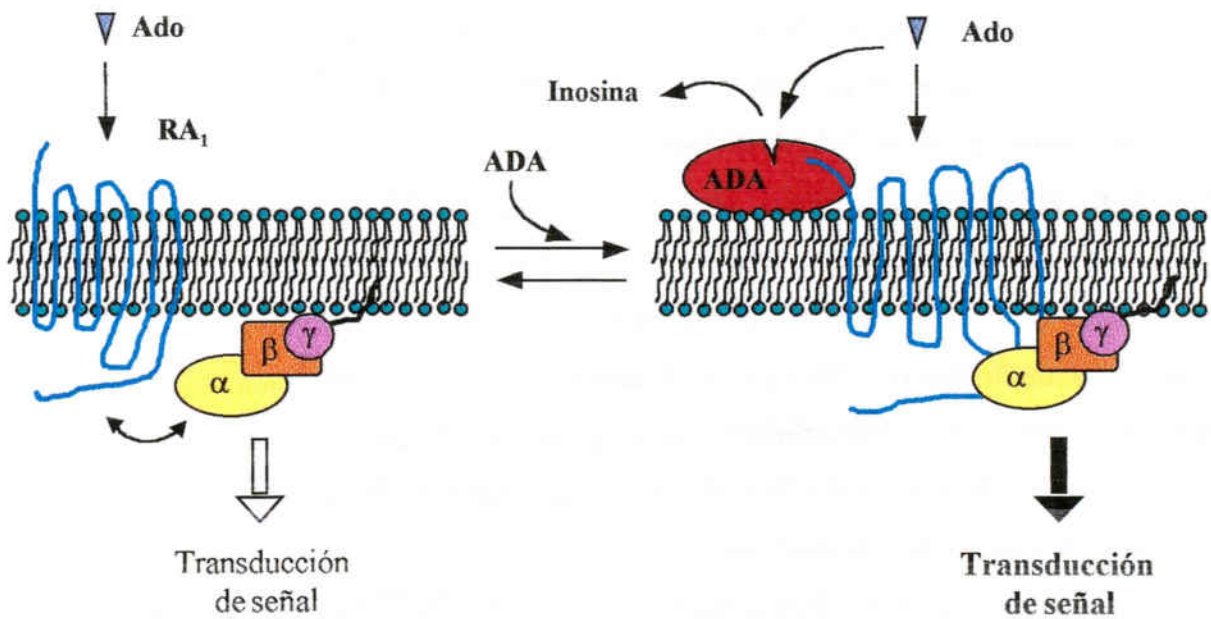


Figura 10. Modelo de interacción entre el receptor  $A_1$  de adenosina y la adenosina desaminasa.

Los datos descritos permiten establecer un modelo de interacción de la ADA y el receptor  $A_1$  de adenosina (Figura 10). Según este modelo, en ausencia de adenosina desaminasa, la unión de la adenosina o de análogos agonistas al receptor  $A_1$  está cinéticamente desfavorecida y provoca un tenue acoplamiento de éste con la proteína  $G_i$  y una débil transducción de la señal. Por el contrario, la interacción de la ecto-ADA con el receptor  $A_1$  en la membrana provoca un cambio conformacional en el receptor, de manera que la unión de ligandos es más efectiva, se favorece su acoplamiento con la proteína  $G_i$  y, consecuentemente, permite una efectiva transducción de la señal.

Una de las características de los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G es la atenuación de la respuesta por estimulación crónica con agonistas. Este fenómeno, conocido con el nombre de desensibilización, evita la sobreestimulación y el posterior daño de la célula. Si bien el proceso de desensibilización ha sido extensamente estudiado para los receptores  $\beta_2$ -adrenérgico (Lohse et al., 1990a, 1990b; Lohse, 1993; Yu et al., 1993; Krueger et al., 1997), este fenómeno es mucho más desconocido en el caso del receptor  $A_1$  de adenosina. Se sabe que la incubación de adipocitos de rata con el agonista R-PIA provoca una pérdida de receptores  $A_1$  de la membrana celular, del contenido total de proteínas  $G_i$  y una disminución de la inhibición de la adenilato ciclasa (Green et al., 1990, 1992). Resultados similares se han obtenido en células granulares de cerebelo (Hettinger-Smith et al., 1996; Vendite et al., 1998), en cortes de cerebro de rata (Abbracchio et al., 1992) y en células DDT<sub>1</sub>MF-2 (Ramkumar et al., 1991). Aunque la desensibilización del receptor  $A_1$  de adenosina ha sido bien caracterizada a nivel farmacológico en numerosos sistemas, hasta la fecha se desconocían los mecanismos moleculares implicados en el proceso de desensibilización e internalización del receptor  $A_1$ , así como la dinámica y los compartimentos intracelulares involucrados en el tráfico intracelular de este receptor. Todo ello, junto con el estudio del papel de la ecto-ADA en este proceso, constituyó el objetivo final de esta Tesis Doctoral.

La distribución del receptor  $A_1$  en la membrana de células de musculatura lisa DDT<sub>1</sub>MF-2 se estudió mediante técnicas de inmunocitoquímica marcando las células con el anticuerpo anti-receptor  $A_1$  PC21 y el posterior análisis mediante microscopía confocal. En condiciones normales de crecimiento, las células DDT<sub>1</sub>MF-2 muestran una distribución homogénea del receptor  $A_1$  en la membrana plasmática. Cuando las células se tratan durante 15-45 min con concentraciones saturantes de agonista R-PIA, los receptores  $A_1$  se agregan y acumulan en zonas

específicas (*clusters*) de la membrana. Al mismo tiempo, se observa que el tratamiento de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 con el agonista R-PIA provoca una disminución de la acumulación de inosítoles fosfatos (IP<sub>3</sub>) y movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular. La pérdida de funcionalidad del receptor A<sub>1</sub> es ya evidente a tiempos cortos (5 min) de incubación con el agonista. La desensibilización homóloga inducida por ligandos en el receptor β<sub>2</sub>-adrenérgico (Lohse et al., 1990a), el de angiotensina II (Oppermann et al., 1996), el δ-opiáceo (Pei et al., 1995), el de neuroquinina N<sub>1</sub> (Garland et al., 1996) y el de colecistoquinina (Rao et al., 1997a, b), correlaciona con la fosforilación del receptor y el desacoplamiento con la proteína G. En nuestro caso, la incubación de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 con el agonista R-PIA induce la fosforilación del receptor a tiempos cortos de exposición al agonista (5 min). Este resultado indica que la fosforilación, la desensibilización funcional y la clusterización del receptor A<sub>1</sub> coinciden en el tiempo, lo que sugiere que estos fenómenos están estrechamente relacionados. Por otro lado, el receptor A<sub>1</sub> posee secuencias consenso de fosforilación para la PKC y PKA en el segundo y tercer bucles intracelulares (Figura 6; Olah et al., 1992; Stiles, 1992). Mediante activadores de la PKC y de la PKA se ha determinado que a tiempos cortos (5 min) y en ausencia de agonista, estas quinasas inducen aumentos en los niveles de fosforilación del receptor A<sub>1</sub>. La activación de estas quinasas también provoca la clusterización del receptor A<sub>1</sub> y la disminución de la formación de segundos mensajeros. Este hecho indica que la fosforilación parece mediar la clusterización y la desensibilización funcional del receptor A<sub>1</sub>. Los aminoácidos del receptor A<sub>1</sub> que aparecen fosforilados después de la exposición al agonista R-PIA son residuos de Ser y Tyr, mientras que si el receptor se fosforila vía PKA o PKC aparecen fosforilados residuos de Ser y Thr. Dado que tanto el agonista R-PIA como la activación de las quinasas PKA y PKC inducen la clusterización y la desensibilización funcional del receptor es probable que la fosforilación en Ser constituya un mecanismo molecular imprescindible para que tengan lugar estos fenómenos. Hasta el momento sólo otro receptor acoplado a proteína G, el receptor de angiotensina II, muestra incrementos de fosforilación en residuos de Tyr en respuesta al agonista (Kai et al., 1994). Si bien no se puede descartar la participación de la fosforilación en tirosina del receptor A<sub>1</sub> en la desensibilización del receptor, el papel fisiológico de esta fosforilación podría estar relacionado con la señalización vía proteínas que poseen dominios SH2.

La incubación de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 con el agonista R-PIA produce una reducción tiempo dependiente del número de centros de unión del agonista en la membrana plasmática. La máxima reducción (50 %) se produce a las 48 h de preincubación ligando-receptor. Un fenómeno

similar ocurre en células granulares de cerebelo (Hettinger-Smith et al., 1996; Vendete et al., 1998). En este sistema, la incubación de las células durante tiempos largos (horas) con el agonista R-PIA conduce a la disminución de los receptores  $A_1$  de la membrana plásmática y un aumento de éstos en la fracción microsomal. Por el contrario, la exposición durante 48 h al antagonista DPCPX produce un incremento (*up-regulation*) del 30 % de los centros de unión de R-PIA en la membrana. Mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo se observa que del 50 % de sitios de unión que desaparecen de la membrana celular después de tratar las células con el agonista, sólo el 30 % son internalizados, mientras que el 20 % restante están presentes en la membrana celular de forma inactiva. Este resultado se puede explicar mediante el modelo de cooperatividad negativa (*cluster-arranged cooperative model*), el cual predice que concentraciones altas de agonistas conducen a sitios de unión del receptor  $A_1$  no detectables debido a que parte de los receptores presentan muy baja afinidad por el ligando (Franco et al., 1996). La internalización de los receptores  $A_1$  inducida por agonistas se pone claramente de manifiesto por técnicas inmunocitoquímicas y microscopía confocal. Después de tiempos largos de exposición (12-48 h) de las células al agonista R-PIA se observa la aparición de pequeñas vesículas que contienen receptores  $A_1$  en el citosol de la célula. Parece que la internalización inducida por agonistas de numerosos receptores acoplados a proteínas G, tales como el  $\beta_2$ AR (Von Zastrow and Kobilka, 1992), el de colecistoquinina (Roettger et al., 1995), el 5-HT $_{2A}$  de serotonina (Berry et al., 1996), el NK1 de neuroquinina (Böhm et al., 1997), los D $_1$  y D $_2$  de dopamina (Ozaki et al., 1994), el de hormona luteinizante (Hoxie et al., 1993) y el de trombina (Ghinea et al., 1992) tiene lugar vía vesículas de clatrina. El receptor  $A_1$  de adenosina ha sido hallado en vesículas de clatrina de cerebro de rata, tanto constitutivamente como tras el tratamiento *in vivo* con el agonista R-PIA (Gonzalez-Calero et al., 1992; Ruiz et al., 1996), indicando que, en este sistema, la internalización del receptor  $A_1$  tiene lugar por la vía de endocitosis clásica.

La activación de la PKC y PKA, conduce también a la internalización del receptor  $A_1$  hacia compartimentos intracelulares, lo que indica que la fosforilación parece ser necesaria para la internalización del receptor  $A_1$ . En algunos receptores acoplados a proteínas G, como los receptores muscarínicos m2 (Tsuga et al., 1994), m3 (Yang et al., 1993) y m4 (Van Koppen et al., 1995) y el  $\beta_2$ AR (Ferguson et al., 1995) la fosforilación inducida por agonistas provoca la internalización de estos receptores. Por el contrario, la internalización del receptor de secretina (Holtmann et al., 1996) y el de colecistoquinina (Rao et al., 1997b) parecen ser independientes de



la fosforilación del receptor, aunque este último proceso está implicado en la desensibilización funcional.

Para determinar si el secuestro del receptor  $A_1$  en compartimentos intracelulares conduce a una degradación (*down-regulation*) de los receptores, se utilizaron técnicas de western-blotting para cuantificar el contenido total de éstos en las células DDT<sub>1</sub>MF-2 incubadas en presencia y ausencia del agonista R-PIA. El agonista induce una pérdida progresiva del número total de receptores  $A_1$  en las células DDT<sub>1</sub>MF-2. La degradación de los receptores  $A_1$  es un proceso tiempo dependiente y más lento que el proceso de internalización. A tiempos largos de saturación con agonista (72 h), los receptores internalizados (43 %) son en gran parte degradados (30 %). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que parte de los receptores acoplados a proteínas G internalizados son degradados vía lisosomal y parte son reciclados a la membrana celular (Lohse, 1993).

Una vez conocida la dinámica del proceso de desensibilización del receptor  $A_1$ , se consideró interesante abordar el estudio de la función que tenía la ecto-ADA en este proceso. Aunque la saturación del receptor  $A_1$  por la ADA no parece modificar la distribución de los receptores  $A_1$  en la membrana de las células DDT<sub>1</sub>MF-2, esa enzima si acelera notoriamente la clusterización inducida por la R-PIA, de manera que este fenómeno es mucho más evidente que en ausencia de ADA exógena. La clusterización del receptor  $A_1$  implica su coclusterización con la ADA, lo que indica que la R-PIA induce la agregación del complejo receptor  $A_1$ -ADA en la membrana plasmática. Tal como se ha comentado anteriormente, simultáneamente al proceso de clusterización del receptor  $A_1$  se produce la fosforilación tiempo dependiente del receptor. La fosforilación del receptor  $A_1$  aumenta rápidamente entre los 5 y 15 min como consecuencia de la estimulación con el agonista R-PIA. Ahora bien, si los receptores  $A_1$  se saturan con ADA exógena, la R-PIA provoca un mayor y más rápido (1 min) incremento en el nivel de fosforilación del receptor  $A_1$ . El otro proceso que ocurre simultáneamente a la fosforilación y clusterización del receptor  $A_1$  es su desensibilización. En este caso, también, la adición de ADA exógena acelera la pérdida de la capacidad de movilizar  $Ca^{2+}$ . Los resultados descritos sugieren que la ADA, al interactuar con el receptor  $A_1$  en la membrana de las células DDT<sub>1</sub>MF-2, potencia y acelera la fosforilación y la clusterización del receptor  $A_1$  inducida por agonistas, lo que conduce rápidamente a la desensibilización funcional de este receptor.

El receptor  $\beta_2$ AR (Pippig et al., 1995; Krueger et al., 1997) y el NK<sub>1</sub> de neuroquinina (Garland et al., 1996), una vez internalizados, se desfosforilan a nivel endosomal lo que conduce

a la resensibilización de estos receptores hacia la membrana plasmática. Por el contrario, la desfosforilación de los receptores  $A_1$  de adenosina en las células DDT<sub>1</sub>MF-2 tiene lugar en la membrana plasmática y, a pesar de que la fosforilación del receptor  $A_1$  vuelve a los niveles basales, la desensibilización continua durante horas. Un hecho parecido se ha descrito también en el receptor de colecistoquinina expresado en células pancreáticas de rata; en este caso la desfosforilación del receptor tiene lugar en la membrana y no impide la desensibilización funcional y la internalización del mismo (Rao et al., 1997b). Es curioso constatar que ese mismo receptor de colecistoquinina expresado en células CHO, tras exposición al agonista, mantiene su estado de fosforilación y desensibilización durante el proceso de internalización (Rao et al., 1997b). Estos datos sugieren diferencias en la regulación de los receptores acoplados a proteínas G dependiendo del tipo de receptor y del sistema celular donde éste se expresa.

Dado que la ADA potencia las fases tempranas del proceso de desensibilización del receptor  $A_1$  inducido por la R-PIA es lógico esperar que active las fases más tardías de este proceso. En ausencia de ADA exógena la estimulación con el agonista R-PIA induce la desaparición ( $t_{1/2} \approx 10h$ ) de los centros de unión del agonista en la superficie de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 mediante un proceso de internalización. En presencia de ADA, el proceso de internalización se acelera ( $t_{1/2} \approx 3h$ ), aunque la máxima internalización (40 %) inducida por el agonista no se modifica.

Dado que la ADA potencia todo el proceso de internalización del receptor  $A_1$  de adenosina y que durante las primeras etapas la enzima y el receptor clusterizan conjuntamente, parecía interesante investigar si la internalización del receptor implicaba la internalización conjunta de la ecto-ADA. La desaparición del receptor  $A_1$  de la membrana inducida por la R-PIA correlaciona con la disminución de la expresión de la ecto-ADA en la membrana, la cual es ya evidente a las 8 h con un máximo (40 %) a las 24 h. La ADA desaparece de la membrana plasmática por un proceso de internalización. La ADA aparece en pequeñas vesículas intracelulares incluso en ausencia de R-PIA. Este proceso independiente de agonista puede representar el reciclaje endógeno de la ecto-enzima. Aunque la internalización de la ADA tiene lugar independientemente del agonista, el tratamiento de las células con R-PIA provoca un aumento drástico de la internalización de la enzima y del tamaño de las vesículas intracelulares que la contienen. Mediante ensayos de doble inmunofluorescencia y posterior análisis mediante microscopía confocal, se ha podido demostrar que la ADA y el receptor  $A_1$  se internalizan conjuntamente en la célula. Estos resultados sugieren una mutua regulación entre el receptor  $A_1$  y

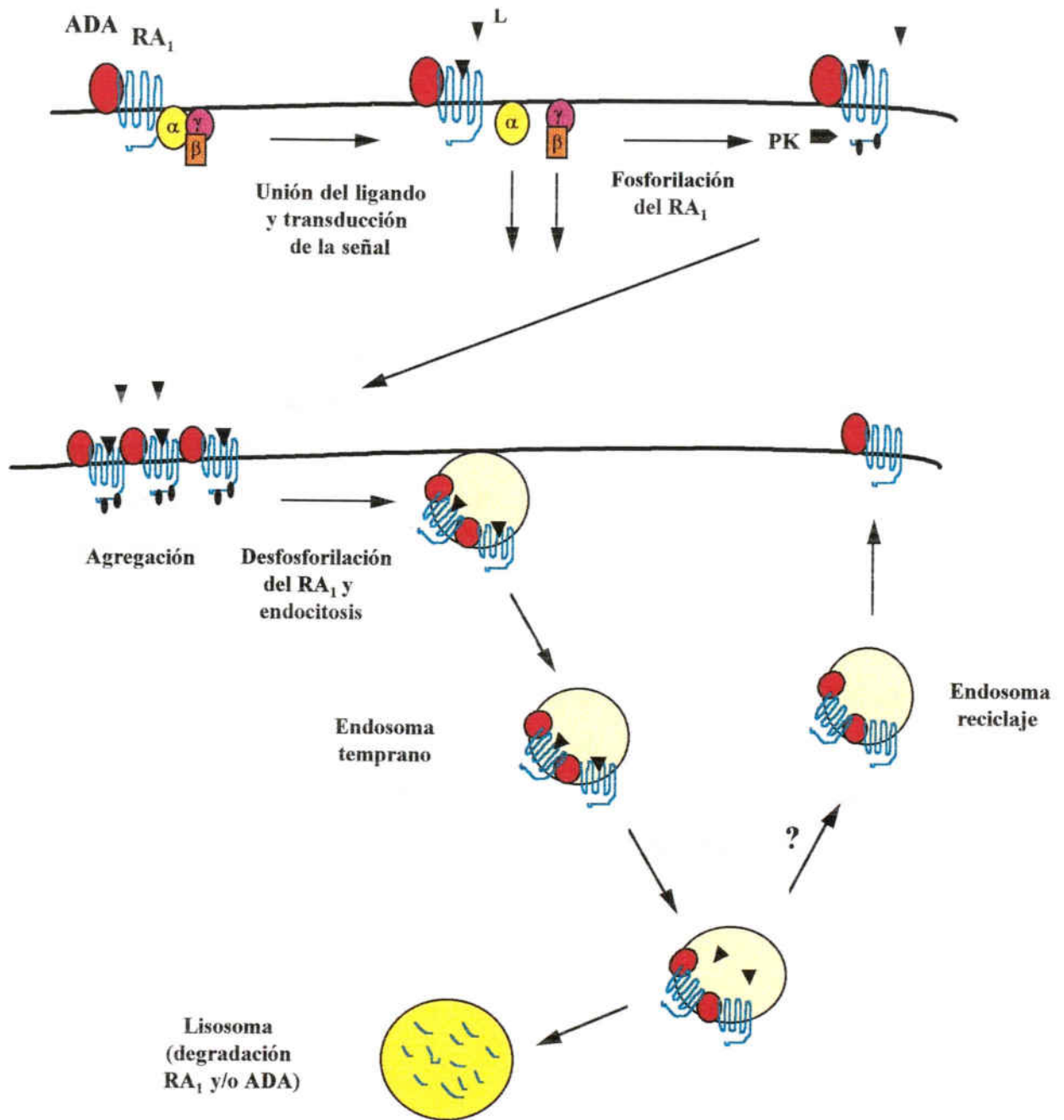


Figura 11. Modelo de desensibilización del receptor A<sub>1</sub> de adenosina y la adenosina desaminasa. (L: ligando; PK: proteína quinasa)

la ecto-ADA en la superficie celular, de manera que las dos proteínas se internalizan siguiendo la misma vía endocítica.

Los resultados obtenidos sugieren un modelo de desensibilización del receptor  $A_1$  de adenosina y de la ADA como el que se resume en la Figura 11. La ADA interacciona con el receptor  $A_1$  de adenosina en la membrana celular de manera que potencia la unión de ligandos y la transducción de la señal. En presencia de concentraciones saturantes de agonista, el receptor  $A_1$  es fosforilado por proteínas quinasas específicas en residuos de Tyr/Ser. La activación de proteínas quinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKC y PKA, también inducen la fosforilación del receptor  $A_1$  y mimetizan el efecto del agonista.

La fosforilación del receptor  $A_1$  impide un nuevo acoplamiento con la proteína  $G_i$  de manera que finaliza la transducción de la señal. Simultáneamente a la fosforilación de los receptores  $A_1$ , éstos se agregan en la membrana celular. Durante todo este proceso, que tiene lugar a tiempos cortos (minutos), la ADA acompaña al receptor  $A_1$ . Además, esta ecto-enzima acelera todos los procesos tempranos (fosforilación, clusterización y el desacoplamiento de la proteína  $G_i$ ) relacionados con la desensibilización homóloga inducida por agonistas del receptor  $A_1$ . En un tiempo más prolongado, el receptor se desfosforila y posteriormente se internaliza junto con la ADA en vesículas de endocitosis. A lo largo del tiempo, el número de vesículas de endocitosis que contienen el receptor  $A_1$  y la ADA disminuye, aunque el tamaño de las mismas aumenta, lo que sugiere una fusión entre ellas. Los receptores internalizados son en parte dirigidos hacia los lisosomas donde son degradados (*down-regulation*) y parte, probablemente, son reciclados hacia la membrana celular.

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. La adenosina desaminasa interacciona molecularmente con el receptor  $A_1$  de adenosina en membranas de corteza cerebral de cerdo y en la membrana de las células de musculatura lisa DDT<sub>1</sub>MF-2. La adenosina desaminasa, independientemente de su actividad catalítica, aumenta la unión de ligandos agonistas y antagonistas al receptor  $A_1$ . Además, esta enzima es necesaria para la aparición del estado de alta afinidad para los agonistas del receptor  $A_1$ . La interacción entre la adenosina desaminasa y el receptor  $A_1$  permite la correcta transducción de la señal inducida por la activación del receptor.

Estos resultados son especialmente importantes porque es la primera vez que se demuestra la interacción y la regulación mutua entre un receptor de la familia de receptores acoplados a proteína G y la enzima que degrada la hormona de este receptor. Además estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una serie de proteínas de membrana, no relacionadas estructuralmente, como son el receptor  $A_1$  de adenosina y el cluster de diferenciación linfocitario CD26, capaces de anclar ecto-ADA a la membrana celular.

2. Se ha demostrado que la estimulación crónica de las células DDT<sub>1</sub>MF-2 con el agonista R-PIA conduce a la desensibilización funcional del receptor  $A_1$ . Este fenómeno se inicia con la saturación del receptor  $A_1$  por el ligando y la rápida fosforilación del receptor en residuos de Ser y Tyr, lo que provoca la clusterización de los receptores en la membrana celular y la pérdida de la funcionalidad de los mismos. Estos cambios moleculares conducen posteriormente al secuestro de los receptores hacia compartimentos intracelulares y su parcial degradación vía lisosomal. La fosforilación del receptor  $A_1$  por activación de la PKA y PKC mimetiza el efecto del agonista y provoca la clusterización, la desensibilización funcional y la internalización de los receptores  $A_1$ , por lo que la fosforilación parece iniciar el resto de procesos involucrados en la desensibilización.

3. La ecto-adenosina desaminasa acelera todos los procesos involucrados en la desensibilización del receptor  $A_1$  inducida por el agonista R-PIA, tales como la fosforilación, la clusterización, la desensibilización funcional y la internalización de los receptores  $A_1$ . El agonista del receptor  $A_1$  es capaz de clusterizar e internalizar conjuntamente al receptor  $A_1$  y a la

ecto-adenosina desaminasa de manera que ambas proteínas son internalizadas siguiendo la misma ruta de endocitosis.

## 6. BIBLIOGRAFÍA



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbraccio, M. P., Brambilla, R., Camisa, M., Rovati, G. E., Ferrari, R., Canevari, L., Dagani, F. and Cattabeni, F. (1995). Adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat brain synaptosomes. Transductional mechanisms, effects on glutamate release, and preservation after metabolic inhibition. *Drug Develop.Res.* **35**, 119-129.
- Abbraccio, 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 A<sub>1</sub> but not A<sub>2</sub> receptors. *Eur. J. Pharm.* **227**, 317-324.
- Agarwal, R. P., Sagar, S. M. and Parks, R. E. Jr. (1975). Adenosine deaminase from human erythrocytes: purification and effects of adenosine analogs. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 693-701.
- Agarwal, R. P., Spector, T. and Parks, R. E. (1977). Tight-binding inhibitors. Inhibition of adenosine deaminase by various inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 359-367.
- Aguilar, J. S., Tan, F. L., Durand, I. and Green, R. D. (1995). Isolation and characterization of an avian A<sub>1</sub> adenosine receptor gene and a related cDNA clone. *Biochem J.* **307**, 729-734.
- Akbar, G. K. M., Dasari, V. R., Webb, T. E., Ayyanathan, K., Pillarisetti, K., Sanhu, A. K., Athwal, R. S., Daniel, J. L., Ashby, B., Barnard, E. and Kunapuli, S. P. (1996). Molecular cloning of a novel P2 purinoceptor from human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 18363-18367.
- Ali, S., Mustafa, S. J. and Metzger, W. J. (1992). Adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic rabbit model: antagonism by theophylline aerosol. *Agon. Actions.* 165-167.
- Allende, G., Franco, R., Mallol, J., Lluís, C., and Canela, E. I. (1991). N-ethylmaleimide affects agonist binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors in the presence than in the absence of ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 213-218.
- Allende, G., Casadó, V., Mallol, J., Franco, R., Lluís, C., and Canela, E. I. (1992). Role of histidine residues in agonist and antagonist binding sites of A<sub>1</sub> adenosine receptor. *J. Neurochem.* **60**, 1525-1533.
- Allgeier, A., Offermanns, S., Van Sande, J., Spicher, K., Schultz, G. and Dumont, J. E. (1994). The human thyrotropin receptor activates G-proteins G<sub>s</sub> and G<sub>q/11</sub>. *J. Biol. Chem.* **269**, 13733-13735.
- Amiche, M., Ducancel, F., Lajeunesse, E., Boulain, J.-C., Menez, A. and Nicolas, P. (1993). Molecular cloning of a cDNA encoding the precursor of adenoregulin from frog skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 983-990.
- Andy, R. J. and Kornfeld, R. (1982). The adenosine deaminase binding protein of human skin fibroblasts is located on the cell surface. *J. Biol. Chem.* **257**, 7922-7925.

- Aran, J. M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrons, J. L. and Franco, R. (1991). Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001-1007.
- Asano, T., Shinohara, H., Morishita, R., Noroka, I., Kato, K. and Endoh, M. (1995). The G-protein G<sub>0</sub> in mammalian cardiac muscle: localization and coupling to A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Biochem.* **117**, 183-189.
- Attramadal, H., Arriza, J. L., Aoki, C., Dawson, Codina, J., Kwatra, M. M., Snyder, S. H., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992).  $\beta$ -arrestin2, a novel member of the arrestin/ $\beta$ -arrestin gene family. *J. Biol. Chem.* **267**, 17882-17889.
- Atwood, T. K., Eliopoulos, E. E. and Findlay, J. B. C. (1991). Multiple sequence alignment of protein families showing low sequence homology. A methodological approach using databases pattern-matching discriminators for G protein-coupled receptors. *Gene.* **98**, 153-159.
- Baer, H. P. and Vriend, R. (1984). Measurement of adenosine metabolism and uptake in smooth muscle and effects of adenosine transport inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 564-570.
- Baldwin, J. M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693-1703.
- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 180-190.
- Ballarin, M., Reiriz, J., Ambrosio, S. and Mahy (1995). Effect of locally infused 2-chloroadenosine, an A<sub>1</sub> receptor agonist, on spontaneous and evoked dopamine release in rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* **185**, 29-32.
- Barak, L. S., Ferguson, S. G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T. and Caron, M. G. (1997). Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact  $\beta_2$ -adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol. Pharmacol.* **51**, 177-184.
- Barbhaiya, H., McClain, R., Ijzerman, A. and Rivkees, S. A. (1996). Site-directed mutagenesis of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor: influences of acidic and hydroxy residues in the first four transmembrane domains on ligand binding. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1635-1642.
- Barrington, W. W., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1989). Demonstration of distinct agonist and antagonist conformations of the A<sub>1</sub> adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13157-13164.
- Bean, B. P. (1992). Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* **13**, 87-90.
- Bellardinelli, L. (1993). Adenosine system in the heart. *Drug Develop. Res.* **28**, 263-267.
- Bellardinelli, L., Shryock, J. C., Ruble, J., Monopoli, A., Dionisotti, S., Ongini, E., Dennis, D. M. and

- Baker, S. P. (1996). Binding of the novel nonxantine A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist [<sup>3</sup>H]-Sch58261 to coronary artery membranes. *Cir.Res.* **79**, 1153-1160.
- Belt, J. A. and Noel, L. D. (1985). Nucleoside transport in Walter 256 rat carcinoma and S49 mouse lymphoma cells. Differences in sensitivity to nitrobenzylthioinosine and thiol reagents. *Biochem. J.* **232**, 681-688.
- Benya, R. V., Kusui, T., Battey, J. F and Jensen, R. T. (1995). Chronic desensitization and down-regulation of the gastrin-releasing peptide receptor are mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **270**, 3346-3352.
- Berry, S. A., Shah, M. C., Khan, N. and Roth, B. L. (1996). Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor occurs via the endosome pathway in vitro. *Mol. Pharmacol.* **50**, 306-313.
- Biaggioni, I. (1992). Contrasting excitatory and inhibitory effects of adenosine in blood pressure regulation. *Hypertension.* **20**, 457-465.
- Birnbaumer, L. (1990). G Proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 675-705.
- Bissonnette, J. M., Hohimer, A. R. and Knopp, S. J. (1991). The effect of centrally administered adenosine on fetal breathing movements. *Respirat. Physiol.* **84**, 273-285.
- Blanco, J., Canela, E. I., Sayós, J., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1993). Adenosine nucleotides and adenosine metabolism in pig kidney proximal tubule membranes. *J. Cell. Physiol.* **157**, 77-83.
- Böhm, S. K., Grady, E. F. and Bunnett, N. W. (1997). Regulatory mechanisms that regulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* **322**, 1-18.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanisms. *Nature.* **349**, 117-127.
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M. F., Benovic, A., Caron, m. G. and Lefkowitz, R. J. (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **262**, 3106-3113.
- Boyer, J. L., Cooper, C. L. and Harden, T. K. (1990). [<sup>32</sup>P]-3'-O-(4-benzoyl)benzoyl ATP as a photoaffinity label for a phospholipase C-coupled P<sub>2Y</sub> purinergic receptor. *J. Biol. Chem.* **165**, 13515-13520.
- Brake, A. J., Wagenbach, M. J. and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* **371**, 519-523.
- Brass, L. F. (1992). Homologous desensitization of He1 cell thrombin receptors distinguishable for proteolysis and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **267**, 6044-6050.

- Broad, R. M. and Fredholm, B. B. (1996). A<sub>1</sub>, but not A<sub>2A</sub>, adenosine receptors modulate electrically stimulated <sup>14</sup>C-acetylcholine release from rat cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 193-197.
- Bruns, R. F., Daly, J. W. and Snyder, S. H. (1980). Adenosine receptors in brain membranes: binding of N<sup>6</sup>-cyclohexyl[<sup>3</sup>H]adenosine and 1,3-diethyl-8-[<sup>3</sup>H]phenylxantine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 5547-5551.
- Bruns, R. F., Lu, G. H. and Pugsley, T. A. (1986). Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labelled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **29**, 331-346.
- Bruns, R. F., Lu, G. H. and Pugsley, T. A. (1987). In: *Topics and perspectives in adenosine research*. pp 59-73. (Eds. E. Gerlach and B. F. Becker). Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bruns, R. F., Fergus, J. H., Coughenour, L. L., Courtland, G. G., Pugsley, T. A., Dodd, J. H. and Tinney, F. J. (1990). Structure-activity relationships for enhancement of adenosine A<sub>1</sub> receptor binding by 2-amino-3-benzylthiophenes. *Mol. Pharmacol.* **38**, 950-958.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., North, R. A. and Surprenant, A. (1996). An antagonist-insensitive P<sub>2x</sub> receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* **15**, 55-62.
- Burnstock, G. (1978). In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones. A multidisciplinary approach*. pp 107-118. (Eds R. W. Straub and L. Bolis). Raven Press, New York.
- Burnstock, G. (1989). In: *Adenosine receptors in the nervous system*. pp. 1-14. (Ed. J. A. Ribeiro). Taylor and Francis, London.
- Bushfield, M., Lavan, B. E. and Houslay, M. D. (1991). Okadaic acid identifies a phosphorylation/dephosphorylation cycle controlling the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory protein. *Biochem. J.* **274**, 317-324.
- Cali, J. J., Balcueva, E. A., Rybalkin, I. and Robishaw, J. D. (1992). Selective tissue distribution of G protein  $\gamma$  subunits, including a new form of the  $\gamma$  subunits identified by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **267**, 24023-24027.
- Casadó, V., Martí, T. Mallol, J., Lluís, C., Canela, E. I. and Franco, R. (1990a). Distribution of A<sub>1</sub> adenosine receptors, adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in brain and other tissues of pig. *Biochem Soc. Trans.* **18**, 639-641.
- Casadó, V., Canti, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C. and Franco, R. (1990b). Solubilization of A<sub>1</sub> adenosine receptor from pig brain: characterization and evidence of the role of the cell membrane on the coexistence of high- and low-affinity states. *J. Neurosci. Res.* **26**, 461-473.
- Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C. and Franco, R. (1991). The binding of [<sup>3</sup>H]R-PIA to A<sub>1</sub> adenosine receptors produces a conversion of the high- to the low-affinity state. *FEBS Lett.* **286**, 221-224.

- Casadó, V., Mallol, J., Canela, E. I., Franco, R., and Lluis, C. (1992). Modulation of the adenosine agonist [ $^3\text{H}$ ]-N<sup>6</sup>(R)Phenylisopropyladenosine binding to pig brain membranes by changes of membrane fluidity and of medium physicochemical characteristics. *Eur. J. Pharmacol.* **225**, 7-14.
- Casadó, V., Mallol, J., Franco, R., Lluis, C. and Canela, E. I. (1994). A<sub>1</sub> adenosine receptors can occur manifesting two kinetic components of 8-cyclopentyl-1,3-( $^3\text{H}$ )dipropylxantine ( $^3\text{H}$ -DPCPX) binding. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **349**, 485-491.
- Casey, P. J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 219-225.
- Castro, E., Pintor, J. and Miras-Portugal, M.T. (1992). Ca<sup>2+</sup> stores mobilization by diadenosine tetraphosphate, Ap<sub>4</sub>A, through a putative P<sub>2Y</sub> purinoceptor in adrenal chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 833-837.
- Catania, M. V., Sortino, M., A., Rampello, P. L. Canonico, P. L. and Nicoletti, F. (1991). Adenosine deaminase increases release of excitatory amino acids through a mechanism independent of adenosine depletion. *Neuropharmacol.* **30**, 153, 159.
- Centelles, J. J., Franco, R., Canela, E. I. and Bozal, J. (1986). Kinetics of the 5'-nucleotidase and the adenosine deaminase in subcellular fractions of the rat brain. *Neurochem. Res.* **11**, 471-479.
- Centelles, J. J., Franco, R. and Bozal, J. (1988). Purification and partial characterization of brain adenosine deaminase: inhibition by purine compounds and by drugs. *J. Neurosci. Res.* **19**, 258-267.
- Chambers, J., Park, J., Cronk, D., Chapman, C., Kennedy, F. R., Wilson, S. and Milligan, G. (1994).  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist-induced down-regulation of G<sub>s</sub> $\alpha$  and functional desensitization in a Chinese hamster ovary cell line expressing a  $\beta_3$ -adrenoceptor refractory to down-regulation. *Biochem. J.* **303**, 973-978.
- Chang, Z., Nygaard, P., Chinault, C. and Kellems, R. E. (1991). Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionary conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry.* **30**, 2273-2280.
- Che, M., Ortiz, D. F. and Arias, I. M. (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular purine-specific Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 13596-13599.
- Chen, C.-C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J. N. (1995). A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* **377**, 428-431.
- Ciruela, F., Casado, V, Mallol, J., Canela, E. I., Lluis, C. and Franco, R. (1995). Immunological identification of A<sub>1</sub> adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* **42**, 818-828.
- Clapham, D. E. and Neer, E. J. (1993). New roles for G protein  $\beta\gamma$  dimers in transmembrane signaling. *Nature.* **365**, 403-406.

- Clark, R. B., Friedman, J., Dixon, R. A. F. and Strader, C. D. (1989). Identification of a specific required for a rapid heterologous desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Pharmacol.* **36**, 343-348.
- Collins, S., Bouvier, M., Bolanowski, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1989). cAMP stimulates transcription of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor gene in response to short-term agonist exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 4853-4857.
- Collins, S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1991). Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 497-508.
- Collo, G., North, R. A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S. and Surprenant, A. (1996). Cloning of P2X<sub>5</sub> and P2X<sub>6</sub> receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* **16**, 2495-2507.
- Communi, D., Parmentier, M. and Boeynaems, J-M. (1996). Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y<sub>6</sub> receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 303-308.
- Conklin, B. R. and Bourne, H. R. (1993). Structural elements of G $\alpha$  subunits that interact with G $\beta\gamma$ , receptors and effectors. *Cell.* **73**, 631-641.
- Conklin, B. R., Farfel, Z., Lustig, K. D., Julius, D. and Bourne, H. R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of G $_{\alpha q}$  to that of G $_{i\alpha}$ . *Nature.* **363**, 274-276.
- Conway, E. J. and Cooke, R. (1939). The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochem. J.* **33**, 479-492.
- Cornfield, L. J., Hu, S., Hurt, S. D. and Sills, M. A. (1992). ([<sup>3</sup>H]-CV1808) labels a novel adenosine receptor in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 552-561.
- Coulson, R., Proch, P. S., Olsson, R. A., Chalfant, C. E. and Cooper, D. R. (1996). Upregulated renal adenosine A<sub>1</sub> receptors augment PKC and glucose transport but inhibit proliferation. *Am. J. Physiol.* **270**, F263-F274.
- Crespo, P., Xu, N. Z., Simonds, W. F. and Gutkind, J. S. (1994). Ras-dependent activation of Map kinase pathway mediated by G-protein  $\beta\gamma$  subunits. *Nature*, **369**, 418-420.
- Cristalli, G., Camaioni, E., Vittori, S., Volpini, R., Borea, P. A., Conti, A., Dionisotti, S., Ongini, E. and Monopoli, A. (1995). 2-alkynyl and 2-heteroalkynyl derivatives of adenosine 5'-ethyluronamide as selective A<sub>2A</sub> adenosine receptor agonists. *J. Med. Chem.* **38**, 1462-1472.
- Cunha R. A. and Sebastiao, A. M. (1991). Extracellular metabolism of adenine nucleotides and adenosine in the innervated skeletal muscle of the frog. *Eur. J. Pharmacol.* **197**, 83-92.

- Cunha, R. A. and Sebastiao, A.M. (1993). Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. *Plügers. Arch.* **424**, 503-510.
- Cunha, R. A., Milusheva, E., Vizi, E. S., Ribeiro, J. A. and Sebastiao, A. M. (1994). Excitatory and inhibitory effects of A<sub>1</sub> and A<sub>2A</sub> adenosine receptor activation on the electrically evoked [<sup>3</sup>H]acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **63**, 207-214.
- Cusack, N. J. (1993). P<sub>2</sub> receptor: subclassification and structure-activity relationships. *Drug. Dev. Res.* **28**, 244-252.
- Daddona, P. E. and Kelley, W. N. (1977). Human adenosine deaminase. Purification and subunit structure. *J. Biol. Chem.* **252**, 110-115.
- Daddona, P. E. and Kelley, W. N. (1978). Human adenosine deaminase binding protein. *J. Biol. Chem.* **253**, 4617-4623.
- Daddona, P. E., Shewach, D. S., Kelley, W. N., Argos, P., Marham, A. F. and Orkin, S. H. (1984). Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **259**, 12101-12106.
- Dagani, F., Cattabeni, F., Canevari, L., Ferrari, R., Camisa, R. and Abbracchio, M. P. (1993). Adenosine receptors in rat brain synaptosomes. Receptor characterization and relationships with glutamate release. *Drug Develop. Res.* **28**, 359-363.
- Daly, J. W., Butts-Lamp, P. and Padgett, W. (1983). Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system. Interaction with caffeine and related methylxantines. *Cell. Mol. Neurobiol.* **3**, 69-80.
- Daly, J. W. and Padgett, W. (1992). Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N<sup>6</sup>-cycloalkyl derivatives at A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem. Pharmacol.* **43**, 1089-1093.
- Daly, J. W., Caceres, J., Moni, R. W., Gusovski, F., Moos, M., Seamon, K. B., Milton, K. and Myers, C. W. (1992). Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: Identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10960-10963.
- Dalziel H., H. and Westfall, D. P. (1994). Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution and molecular characterization. *Pharmacol. Rev.* **46**, 449-466.
- De May, J. and Vanhoutte, P. M. (1981). Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J. Physiol (London).* **316**, 347-355.
- De Meester, I., Vanhoof, G., Lambeir, A-M. and Scharpé (1996). Use of immobilized adenosine deaminase (EC 3.5.4.4) for the rapid purification of native human CD26/dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5). *J. Immunol. Methods.* **189**, 99-105.

- Deblasi, A., Parruti, G. and Sallese, M. (1995). Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T-lymphocytes. Selective increase of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 1 and kinase 2. *J. Clin. Invest.* **95**, 203-210.
- Deckert, J., Nöthen, M. M., Bryant, S. P., Ren, H., Wolf, H. K., Stiles, G. L., Spurr, N. K. and Propping, P. (1995). Human adenosine A<sub>1</sub> receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 614-621.
- Denker, B. R., Neer, E. J. and Schmidt, C. J. (1992). Mutagenesis of the amino terminus of the  $\alpha$ subunit of the G protein G<sub>0</sub>: in vitro characterization of  $\alpha_0\beta\gamma$  interactions. *J. Biol. Chem.* **267**, 6272-6277.
- Dennis, D. M., Shryock, J. C. and Belardinelli, L. (1995). Homologous desensitization of the A<sub>1</sub>-adenosine receptor system in the guinea pig atrioventricular node. *J. Pharm. Exp. Ther.* **272**, 1024-1035.
- Dickenson, J. M. and Hill, S. J. (1993). Adenosine A<sub>1</sub>-receptor stimulated increases in intracellular calcium in the smooth muscle cell line, DDT<sub>1</sub>MF-2. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 85-92.
- Dinjens, W. N. M., van der Boon, J., Kate, J., Zeijlemaker, W. P., de Bruijn, C. H. M. M., Bosman, F. T. and Khan, P. M. (1986). Cell surface adenosine deaminase (ADA) and its complexing protein (ADCP) in human T-lymphoid cells. *Adv. Expl. Med. Biol.* **195B**, 407-414.
- Dinjens, W. N. M., Kate, J., Wijnen, J. Th., van der Linden, E. P. M., Beek, C. J. L., Lenders, M.-H. J. H., Khan, P. M. and Bosman, F. T. (1989). Distribution of adenosine deaminase-complexing protein in murine tissues. *J. Biol. Chem.* **264**, 19215-19220.
- Dixon, A. K., Gubitz, A. K., Sirinathsinghji, D. J. S., Richardson, P. J. and Freeman, T. C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor mRNA in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1461-1468.
- 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. *J. Physiol.* **373**, 47-61.
- Dong, R. P., Kameoka, J., Hegen, M., Tanaka, T., Xu, Y., Schlossman, S. F. and Morimoto, C. (1996). Characterization of adenosine deaminase binding human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J. Immunol.* **156**, 1349-1355.
- Drake, M. E. and Petersen, S. A. (1992). ATP overflow from the mouse isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 825-830.
- Driessen, B., von Kügelgen, I. and Starke, K. (1994). P<sub>1</sub>-purinoceptor-mediated modulation of neural noradrenaline and ATP release in guinea-pig vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 42-48.
- Dunwiddie, T. V., Abbracchio, M. P., Bischofberger, N., Brundage, J. M., Buell, G., Collo, G., Corsi, C., Diao, L., Kawashima, E., Jacobson, K. A., Latini, S., Lin, R. C. S., North, R. A., Pazzagli, M., Pedata, F.,



- Pepeu, G. C., Proctor, W. R., Rassendreu, F., Surprenant, A. and Cattabeni, F. (1997). Purinoceptors in the central nervous system. *Drug Develop. Res.* **39**, 361-370.
- Elhashim, A., Dagostino, B., Matera, M. G. and Page, C. (1996). Characterization of adenosine receptors involved in adenosine-induced bronchoconstriction in allergic rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1262-1268.
- Fastbom, J. and Fredholm, B. B. (1990). Effects of long-term theophylline treatment on adenosine A<sub>1</sub>-receptors in rat brain: autoradiographic evidence for increased receptor number and altered coupling to G-proteins. *Brain Res.* **507**, 195-199.
- Fein, T., Schulze, E., Bär, J. and Schwabe, U. (1994). Purification and characterization of an adenotin-like adenosine binding protein from human platelets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **349**, 374-380.
- Ferguson, S. S. G., Ménard, L., Barak, L. S., Koch, W. J., Colaprieto, A-M. and Caron, M. G. (1995). Role of phosphorylation in agonist-promoted  $\beta_2$ -adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* **270**, 24782-24789.
- Ferguson, S. S. G., Downey, W. E., Colaprieto, A-M., Barak, L. S., Menard, L. and Caron, M. G. (1996). Role of  $\beta$ -arrestin in mediating agonist-promoted G-protein-coupled receptor internalization. *Science.* **271**, 363-366.
- Fernandez, M., Svenningsson, P. and Fredholm, B. B. (1996). Adaptative changes in adenosine receptors following long-treatment with the adenosine receptor agonist R-PIA. *Life Sci.* **58**, 769-776.
- Fiedler, J. L., Pollard, H. B. and Rojas, E. (1992). Quantitative analysis of depolarization-induced ATP release from mouse brain synaptosomes. External calcium dependent and independent processes. *J. Membr. Biol.* **127**, 21-33.
- Figler, R. A., Graber, S. G., Lindorfer, M. A., Yasuda, H., Linden, J. and Garrison, J. C. (1996). Reconstitution of recombinant bovine A<sub>1</sub> adenosine receptors in Sf9 cell membranes with recombinant G proteins of defined composition. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1587-1595.
- Fini, C., Palmerini, C. A., Damiani, P., Stochaj, U., Mannherz, H. G. and Floridi, A. (1990). 5'-nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1038**, 18-22.
- Fisher, M. N. and Newsholme, E. A. (1984). Properties of rat-heart adenosine kinase. *Biochem. J.* **221**, 521-528.
- Fleischer, B. (1987). A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. *J. Immunol.* **138**, 1346-1349.
- Fleischer, B. (1994). CD26: a surface protease involved in T-cell activation. *Immunol. Today.* **15**, 180-184.

- Fonoll, C., Canela, E. I. and Bozal, J. (1982). Characterization of the forms of bovine liver adenosine deaminase. *Int. J. Biochem.* **14**, 679-683.
- Franco, R., Canela, E. I. and Bozal, J. (1986). Heterogenous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum. *Neurochem. Res.* **11**, 423-435.
- Franco, R., Aran, J.M., Colomer, D., Matutes, E. and Vives-Corrons, J. L. (1990). Association of adenosine deaminase with erythrocyte and platelet plasma membrane: an immunological study using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 653-660.
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Mallol, J., Lluís, C. and Canela, E.I. (1996). The cluster-arranged cooperative model: a model that accounts for kinetics of binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Biochemistry.* **35**, 3007-3015.
- Fredholm, B. B. (1995). Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* **76**, 228-239.
- Fredholm, B. B. and Sollevi, A. (1986). Cardiovascular effects of adenosine. *Clinical Physiol.* **6**, 1-21.
- Fredholm, B. B. and Dunwiddie, T. V. (1988). How does adenosine inhibit transmitter release?. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 130-134.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, K., Jacobson, K. A., Leff, P. and Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* **46**, 143-156.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Dubyak, G. R., Harden, K., Jacobson, K. A., Schwabe, U. and Williams, M. (1997). Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 79-82.
- Freissmuth, M., Selzer, E. and Shutz, W. (1991). Interactions of purified bovine brain adenosine A<sub>1</sub> receptors with G proteins. Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding. *Biochem. J.* **275**, 651-656.
- Freund, S., Ungerer, M. and Lohse, M. J. (1994). A<sub>1</sub> adenosine receptors expressed in CHO-cells couple to adenylyl cyclase and to phospholipase C. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 49-56.
- Frick, L., Wolfenden, L., Smal, E. and Baker, D. C. (1986). Transition-state stabilization by adenosine: structural studies of its inhibitory complex with deoxycoformycin. *Biochemistry.* **25**, 1616-1621.
- Furlong, T. J., Pierce, K. D., Selbie, L. A. and Shine, J. (1992). Molecular characterization of a human brain adenosine A<sub>2</sub> receptor. *Mol. Brain. Res.* **15**, 62-66.
- Garland, A. M., Grady, E. F., Lovett, M., Vigna, S. R., Frucht, M. M., Krause, J. E. and Bunnet, N. W. (1996). Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin<sub>1</sub> and neurokinin<sub>2</sub> receptors. *Mol. Pharmacol.* **49**, 438-446.

- Garritsen, A., Zhang, Y. and Cooper, D. M. F. (1992). Purinergic receptor regulation of signal transduction in NCB-20 cells. *Mol. Pharmacol.* **41**, 743-749.
- Geiger, J. D. and Fyda, D. M. (1991). Adenosine transport in nervous system tissues. In: *Adenosine in the nervous system*. pp. 1-24. (Ed. T. Stone). Academic Press, London.
- Gerwins, P., Nordstedt, C. and Fredholm, B. B. (1990). Characterization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in intact DDT<sub>1</sub>MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **38**, 660-666.
- Gerwins, P. and Fredholm, B. B. (1992). ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-triphosphate in a smooth muscle cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 16081-16087.
- Ghinea, N., Vuhai, M. T., Groyer-Picard, M. T., Houllier, A., Schoevaert, D. and Milgrom, E. (1992). Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: immunoelectron microscopic studies in Leyding cells and transfected L-cells. *J. Cell Biol.* **118**, 1347-1358.
- Gonçalves, J. and Querez, G. (1993). Facilitatory and inhibitory modulation by endogenous adenosine of noradrenaline release in the epididymal portion of rat vas deferents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **348**, 367-371.
- Gonzalez-Calero, G., Martín, M., Cubero, A. and Andrés, A. (1990). Bovine brain coated vesicles contain adenosine A<sub>1</sub> receptors. Presence of adenylate cyclase coupled to the receptor. *J. Neurochem.* **55**, 106-113.
- Gonzalez-Calero, G., Cubero, A. and Klotz, K-N. (1992). G-protein-coupled A<sub>1</sub> adenosine receptors in coated vesicles of mammalian brain: characterization by radioligand binding and photoaffinity labelling. *Cell. Signal.* **4**, 737-745.
- Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1996).  $\beta$ -arrestin acts a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Nature.* **383**, 447-450.
- Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Gurevich, V. V., Benovic, J. L., Keen, J. H. (1997). Arrestin/Clathrin interaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 15017-15022.
- Gordon, J. L., Pearson, J. D., Dickinson, E. S., Moreau, D. and Slakey, L. L. (1989). The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 18986-18992.
- Green, A. (1987). Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **262**, 15702-15707.
- Green, A., Johnson, J. L. and Milligan, G. (1990). Down-regulation of G<sub>i</sub> sub-types by prolonged incubation of adipocytes with an A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist. *J. Biol. Chem.* **265**, 5206-5210.

- Green, A. Milligan, G. and Dobias, S. B. (1992). G<sub>i</sub> down-regulation as a mechanism for heterologous desensitization in adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 3223-3229.
- Griffith, D. A. and Jarvis S. M. (1996). Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 153-181.
- Griffiths, M., Beaumont, N., Yao, S. Y. M., Sundaram, M., Boumah, C. E., Davies, A., Kwong, F. Y. P., Coe, I., Cass, C. E., Young, J. D. and Baldwin, S. A. (1997). Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature Medicine.* **3**, 89-93.
- Gu, J. G. and Geiger, J. D. (1992). Transport and metabolism of D-[<sup>3</sup>H]Adenosine and L-[<sup>3</sup>H]Adenosine in rat cerebral cortical synaptoneuroosomes. *J. Neurochem.* **58**, 1699-1705.
- Gudermann, T., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L. (1992). Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca<sup>2+</sup> mobilization. Studies with the cloned luteinizing hormone receptor expressed in L-cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 4479-4488.
- Gurden, M. F., Coates, J., Ellis, F., Evans, B., Foster, M., Hornby, E., Kennedy, I., Martin, D. P., Strong, P., Vardey, C. J and Wheeldon, A. (1993). Functional characterization of three adenosine receptor types. *Br. J. Pharmacol.* **109**, 693-698.
- Gutierrez, M. M., Brett, C. M., Ott, R. J., Hui, A. C. and Giacomini, K. M. (1992). Nucleoside transport in brush border membrane vesicles from human kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **1105**, 1-9.
- Hadcock, J. R., Wang, H.-Y. and Malbon, C. C. (1989). Agonist-induced destabilization of β-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of β-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **264**, 19928-19933.
- Hadcock, J. R., Ros, M., Watkins, D. C. and Malbon, C. C. (1990). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* **265**, 14784-14790.
- Hadcock, J. R., Port, J. D. and Malbon, C. C. (1991). Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. *J. Biol. Chem.* **266**, 11915-11922.
- Hadcock, J. R. and Malbon, C. C. (1993). Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G proteins. *J. Neurochem.* **60**, 1-9.
- Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. and Uchiyama, H. (1996). Phosphorylation of human M1 muscarinic acetylcholine receptors by G protein-coupled receptor kinase 2 and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 2776-2782.
- Hancock, D. L. and Coupar, I. M. (1995). Functional characterization of the adenosine receptor mediating inhibition of peristalsis in the rat jejunum. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 739-744.

- Helmreich, E. J. M. and Hofmann, K.-P. (1996). Structure and function of proteins in G-protein-coupled signal transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1286**, 285-322.
- Hepler, J. R. and Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 383-387.
- Hershfield, M. S. and Mitchell, B. S. (1995). Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: *The metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. II, pp 1725-1768. (Eds. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle). McGraw-Hill, N. Y.
- Hettinger-Smith, B. D., Leid, M. and Murray, T. F. (1996). Chronic exposure to adenosine receptor agonist and antagonists reciprocally regulates the A<sub>1</sub> adenosine receptor-adenylyl cyclase system in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **67**, 1921-1930.
- Hide, I., Padgett, W. L., Jacobson, K. A. and Daly, J. W. (1992). A<sub>2A</sub> adenosine receptors from rat striatum and rat pheochromotoma PC12 cells. Characterization with radioligand binding and by activation of adenylate cyclase. *Mol. Pharmacol.* **41**, 352-359.
- Hilderman, R. H., Martin, M., Zimmerman, J. K. and Pivorun, E. B. (1991). Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5'5'''-P<sub>1</sub>, P<sub>4</sub>-tetrphosphate. *J. Biol. Chem.* **266**, 6915-6918.
- Hill, R. J., Oleynek, J. J., Hoth, C. F., Kiron, M. A. R., Weng, W., Wester, R. T., Tracey, W. R., Knight, D. R., Buchholz, R. A. and Kennedy, S. P. (1997). Cloning, expression and pharmacological characterization of rabbit adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 122-128.
- Hirschhorn, R. and Ratech H. (1980). Isozymes of adenosine deaminase. In: *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*. pp. 131-155. Alan E. Liss, Inc., New York.
- Hirschhorn, R., Yang, D. R. and Israni, A. (1994). An Asp<sup>8</sup>Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA-2 allozyme). Occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann. Hum. Genet.* **58**, 1-9.
- Holtmann, M. H., Rettger, B. F., Pinon, D. I. and Miller, L. J. (1996). Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalization of the secretin receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 23566-23571.
- Hosoda, K., Fitzgerald, L. R., Vaidya, V. A., Feussner, G. K., Fishman, P. H. and Duman, R. S. (1995). Regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptor mRNA and gene transcription in rat C<sub>6</sub> glioma cells: effects of agonist, forskolin, and protein synthesis inhibition. *Mol. Pharmacol.* **48**, 206-211.
- Hough, C. and Chuang, D. M. (1990). Differential down-regulation of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptor mRNA in C<sub>6</sub> glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 46-52.
- Hourani, S. M. O., Nicholls, J., Lee, B. S. S., Halfhide, E. J. and Kitchen, I. (1993). Characterization and ontogeny of P<sub>1</sub>-purinoceptors on rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 754-758.

- Hoxie, J. A., Ahuja, M., Belmonte, E., Pizarro, S., Parton R. and Brass, L. F. (1993). Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 13756-13763.
- Huang, Q. Q., Yao, S. Y. M., Ritzel, M. W., Paterson, A. R. P., Cass, C. E. and Young, J. D. (1994). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17757-17760.
- Huang, Z., Chen, Y. and Nissenson, R. A. (1995). The cytoplasmic tail of the G-protein-coupled receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein contains positive and negative signals for endocytosis. *J. Biol. Chem.* **270**, 151-156.
- Humphries, R. G., Tomlinson, W., Ingall, A. H., Kindon, N. D. and Leff, P. (1993). FPL66096: a novel, highly potent and selective antagonist at human platelet P<sub>2T</sub>-purinoceptor. *Br. J. Pharmacol.* **110** (Suppl.):42P, 1993.
- Hutchinson, A. J., Williams, M., De Jesus, R., Yokoyama, R., Oei, H. H., Ghai, G. R., Webb, R. L., Zoganas, H. C., Stone, G. A. and Jarvis, M. F. (1990). 2-(Arylalkylamino)adenosin-5'-uronamides. A new class of highly selective adenosine A<sub>2</sub> receptor ligands. *J. Med. Chem.* **33**, 1919-1924.
- Hutchison, K. A. and Fox, I. H. (1989). Purification and characterization of the adenosine A<sub>2</sub>-like binding site from human placental membranes. *J. Biol. Chem.* **264**, 19898-19903.
- Inglese, J., Freedman, N. J., Koch, W. J. and Lefkowitz, R. J. (1993). Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases. *J. Biol. Chem.* **268**, 23735-23738.
- Iredale, P. A., Alexander, S. P. H. and Hill, S. J. (1994). Coupling of a transfected human brain A<sub>1</sub> adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilization via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 1252-1256.
- Jacobson, K. A. (1990). Adenosine (P<sub>1</sub>) and ATP (P<sub>2</sub>) receptors. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Vol 3: Membranes and receptors. pp 601-642. (Eds. C. Hansch, P. G. Sammes, J. B. Taylor). Pergamon Press, Oxford
- Jacobson, K. A., Ukena, D., Kirk, K. L. and Daly, J. W. (1986). [<sup>3</sup>H]Xantine amine congener of 1,3-dipropyl-8-phenylxantine, an antagonist radioligand for adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4089-4093.
- Jacobson, K. A., van Galen, P. J. M., Ji, X.-D., Ramkumar, V., Olah, M. E. and Stiles, G. L. (1993). Molecular characterization of A<sub>1</sub> and A<sub>2a</sub> adenosine receptors. *Drug Develop. Res.* **28**, 226-231.
- Jarvis, M. F., Schulz, R., Hutchison, A. J., Do, U. H., Sills, M. A. and Williams, M. (1989). [<sup>3</sup>H]-CGS21680C, a selective A<sub>2</sub> adenosine receptor agonist directly labels A<sub>2</sub> receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 888-893.
- Jarvis, S. M. (1988). Adenosine transporters. In: *Adenosine Receptors*. pp 113-123. (Eds. D. M. F. Cooper and C. Londos). Alan R., Liss Inc., New York.

- Jeanfavre, D. D., Woska, J. R., Pargellis, C. A., Kennedy, C. A., Prendergast, J., Stearns, C., Reilly, P. L., Barton, R. W. and Bormann, B. J. (1996). Effect of deoxycoformycin and val-boropro on the associated catalytic activities of lymphocyte CD26 and ecto-adenosine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1757-1765.
- Jin, S., Johansson, B. and Fredholm, B. B. (1993). Effects of adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptor activation on electrically evoked dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 801-808.
- Jockers, R., Linder, M. E., Hohenegger, M., Nanoff, C., Bertin, B., Strosberg, A. D., Marullo, S. and Freissmuth, M. (1994). Species difference in the G protein selectivity of the human and bovine A<sub>1</sub>-adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 32077-32084.
- Kagaya, A., Mikuni, M., Kusumi, I., Yamamoto, H. and Takahashi, K. (1990). Serotonin-induced acute desensitization of serotonin-2 receptors in human platelets via a mechanism involving protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 305-311.
- Kai, H., Griendling, K. K., Lassègue, B., Ollerenshaw, J. D., Runge, M. S. and Alexander, R. W. (1994). Agonist-induced phosphorylation of the vascular type I angiotensin II receptor. *Hypertension.* **24**, 523-527.
- Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F. and Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science.* **261**, 466-469.
- Karton, Y., Jiang, J. L., Ji, X. D., Melman, N., Olah, M. E., Stiles, G. L. and Jacobson, K. A. (1996). Synthesis and biological activities of flavonoid derivatives as A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **39**, 2293-2301.
- Kaushal, S., Ridge, K. D. and Khorana, H. G. (1994). Structure and function in rhodopsin: The role of asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4024-4028.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M. and Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 349.
- Keef, K., Pasco, J. S. and Eckman, D. M. (1992). Purinergic relaxation and hyperpolarization in guinea-pig and rabbit coronary artery: role of the endothelium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**, 592-600.
- Kennedy, C., Delbro, D. and Burnstock, G. (1985). P<sub>2</sub>-purinoceptors mediate both vasodilation (via the endothelium) and vasoconstriction of the isolated rat femoral artery. *Eur. J. Pharmacol.* **107**, 161-168.
- Kilprattick, B. F. and Caron, M. G. (1983). Agonist binding promotes a guanine-nucleotide reversible increase in the apparent size of the bovine anterior pituitary dopamine receptors. *J. Biol. Chem.* **258**, 13528-13534.

Kitakaze, M., Hori, M., Minamino, S. T., Komamura, K., Node, K., Kurihara, T., Morioka, T., Sato, H., Inoue, M. and Kamada, T. (1994). Evidence for deactivation of both ectosolic and cytosolic 5'-nucleotidase by adenosine A<sub>1</sub> receptor activation in rat cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* **94**, 2451-2456.

Klotz, K. N., Cristalli, G., Grifantini, M., Vittori, S. and Lohse, M. J. (1985). Photoaffinity labeling of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **260**, 14659-14664.

Klotz, K. N., Lohse, M. J. and Schwabe, U. (1988). Chemical modification of A<sub>1</sub> adenosine receptors in rat brain membranes. Evidence for histidine in different domains of the ligand binding site. *J. Biol. Chem.* **260**, 14659-14663.

Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. and Lefkowitz, R. J. (1993). The binding site for  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins on the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 8256-8260.

Koenig, J. A. and Edwardson, J. M. (1996). Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type. *Mol. Pharmacol.* **49**, 351-359.

Kohno, Y., Ji, X. D., Mawhorter, S. D., Koshiba, M. and Jacobson, K. A. (1996). Activation of A<sub>3</sub> adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood.* **88**, 3569-3574.

Krueger, K. M., Daaka, Y., Pitcher, J. A. and Lefkowitz, R. J. (1997). The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **272**, 5-8.

Krupnick, J. G., Goodman, O. B., Keen, J. H. and Benovic, J. L. (1997). Arrestin/Clathrin interaction. *J. Biol. Chem.* **272**, 15011-15016.

Kurtz, A. (1987). Adenosine stimulates guanylate cyclase activity in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 6296-6300.

Kurtz, A., Della Bruna, R., Pfeilschifter, J. and Bauer, C. (1988). Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* **33**, 798-803.

Kurz, L. C., La Zard, D. and Frieden, C. (1985). Changes accompanying formation of enzymatic transition-states. Tryptophan environment in ground-state and transition-state analog complexes of adenosine deaminase. *Biochemistry.* **24**, 1342-1346.

Kurz, L. C. and Frieden, C. (1987). Adenosine deaminase converts purine riboside into an analogue of a reactive intermediate: a <sup>13</sup>C NMR and kinetic study. *Biochemistry.* **26**, 8450-8457.

Kurz, L. C., Weitkamp, E. and Frieden, C. (1987). Adenosine deaminase: viscosity studies and mechanism of binding of substrate and of ground and transition-state analogue inhibitors. *Biochemistry.* **26**, 3027-3032.

Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* **379**, 311-319.



- Larroy, D., Galitzky, J. and Lafontan, M. (1991). A<sub>1</sub> adenosine receptors in the human fat cell: tissue distribution and regulation of radioligand binding. *Eur. J. Pharmacol.* **206**, 139-147.
- Lee, C. W. and Jarvis, S. M. (1988). Nucleoside transport in rat cerebral-cortical synaptosomes. *Biochem. J.* **249**, 557-564.
- Lee, H. T., Thompson, C. I., Hernandez, A., Lewy, J. L. and Brlloni, F. L. (1993). Cardiac desensitization to adenosine analogues after prolonged R-PIA infusion in vivo. *Am. J. Physiol.* **265**, H1916-H1927.
- Lefkowitz, R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell.* **74**, 409-412.
- Leurs, R. Smit, M. J., Bast, A. and Timmerman, H. (1991). Homologous histamine H1 receptor desensitization results in reduction of H1 receptor agonist efficacy. *Eur. J. Biochem.* **196**, 319-322.
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G. and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X<sub>2</sub> and P2X<sub>3</sub> receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* **377**, 432-435.
- Libert, F., Van Sande, J., Lefort, A., Czernilofsky, A., Dumont, J. E., Vassart, G., Ensinger, H. A. and Mendla, K. D. (1992). Cloning and functional characterization of a human A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 919-926.
- Linden, J. (1989). Adenosine deaminase for removing adenosine: how much is enough?. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 260-262.
- Linden, J. (1991). Structure and function of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *FASEB J.* **5**, 2668-2676.
- Linden, J. (1994). Cloned adenosine A<sub>3</sub> receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 298-306.
- Linden, J., Taylor, H. E., Robeva, A. S., Tucker, A. L., Stehle, J. H., Rivkees, S., Fink, J. S. and Reppert, S. M. (1993). Molecular cloning and functional expression of a sheep A<sub>3</sub> adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol. Pharmacol.* **44**, 524-532.
- Linder, M. E., Ewald, D. A., Miller, R. J. and Gillman, A. G. (1990). Purification and characterization of G<sub>0α</sub> and three types of G<sub>iα</sub> after expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8243-8251.
- Lohse, M. J. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**, 171-188.
- Lohse, M. J., Lenschow, V. and Schwabe, U. (1984). Two affinity states of R<sub>i</sub> adenosine receptors in brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **26**, 1-9.
- Lohse, M. J., Klotz, K. N. and Schwabe, U. (1986). Agonist photoaffinity labelling of A<sub>1</sub> adenosine receptors: persistent activation reveals spare receptors. *Mol. Pharmacol.* **30**, 403-409.

Lohse, M. J., Klotz, K.-N., Lindenborn-Fotinos, J., Reddington, M., Schwabe, U. and Olsson, R. A. (1987). 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxantine (DPCPX): a new selective, high affinity antagonist radioligand for A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* **336**, 204-210.

Lohse, M. J., Klotz, K.-N., Schwabe, U., Cristalli, G., Vittori, S. and Grifantini, M. (1988). 2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Naunyn-Schmeideberg's Arch Pharmacol.* **337**, 687-689.

Lohse, M. J., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Benovic, J. L. (1989). Inhibition of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 3011-3015.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990a). Multiple pathways of rapid  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* **265**, 3202-3209.

Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1990b).  $\beta$ -arrestin: a protein that regulates  $\beta_2$ -adrenergic receptor function. *Science.* **248**, 1547-1550.

Londos, C., Cooper, D. M. F. and Wolff, T. (1980). Subclasses of external adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 2551-2554.

Longabaugh, J. P., Didsbury, J., Spiegel, A. and Stiles, G. L. (1989). Modification of the rat adipocyte A<sub>1</sub> adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A<sub>1</sub> adenosine receptor agonist: alterations in the subunit of G<sub>s $\alpha$</sub>  and G<sub>i $\alpha$</sub>  are not associated with changes in their mRNAs. *Mol. Pharmacol.* **36**, 681-688.

Lorenzen, A., Nitsch-Kirsch, M., Vogt, H. and Schwabe, U. (1993a). Characterization of membrane-bound and solubilized high-affinity binding sites for 5'-N-ethylcarboxamido[<sup>3</sup>H]adenosine from bovine cerebral cortex. *J. Neurochem.* **60**, 745-751.

Lorenzen, A., Fuss, M., Vogt, H. and Schwabe, U. (1993b). Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A<sub>1</sub> adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[<sup>35</sup>S]thio)triphosphate binding. *Mol. Pharmacol.* **44**, 115-123.

Lorenzen, A., Grobekathöfer, B., Kerst, B., Vogt, H., Fein, T. and Schwabe, U. (1996a). Characterization of a novel adenosine binding protein sensitive to cyclic AMP in rat brain cytosolic and particulate fractions. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1375-1385.

Lorenzen, A., Guerra, L., Vogt, H. and Schwabe, U. (1996b). Interaction of full and partial agonists of the A<sub>1</sub> adenosine receptor with receptor/G protein complexes in rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **49**, 915-926.

Lupas, A. N., Lupas, J. M., and Stock, J. B. (1992). Do G protein subunits associate via a three-stranded coiled-coil?. *FEBS Lett.* **314**, 105-108.

- Lupidi, G., Falasca, M., Marmochi, F., Venardi, G., Cristalli, G. and Riva, F. (1992). Adenosine deaminase from bovine brain: purification and partial characterization. *Biochem. Int.* **26**, 1053-1063.
- Luthin, D. R. and Linden, J. (1995). Comparison of A<sub>4</sub> and A<sub>2A</sub> binding sites in striatum and COS cells transfected with adenosine A<sub>2A</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **272**, 511-518.
- Maenhaut, C., Van Sande, J., Libert, F., Abramowicz, M., Parmentier, M., Vanderhaegen, J.-J., Dumont, J. E., Vassart, G. and Schiffman, S. (1990). RDC8 codes for an adenosine A<sub>2</sub> receptor with physiological constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 1169-1178.
- Mahan, L. C., Mcvittie, L. D., Smyk-Randall, E. M., Nakata, H., Monsma, F. J., Gerfen, C. R. and Sibley D. R. (1991). Cloning and expression of an A<sub>1</sub> adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **40**, 1-7.
- Marguet, D., Bernard, A. M., Vivier, I., Darmoul, D., Naquet, P. and Pierres, M. (1992). cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule; a multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **267**, 2200-2208.
- Marrone, T. J., Straatsma, T. P., Briggs, J. M., Wilson, D. K., Quioco, F. A. and Mccammon, J. A. (1996). Theoretical study of the inhibition of adenosine deaminase by (8R)-coformycin and (8R)-deoxycoformycin. *J. Med. Chem.* **39**, 277-284.
- Martín, M., Centelles, J. J., Hugué, J., Echevarne, F., Colomer, D., Vives-Corrons, J. L. and Franco, R. (1993). Surface expression of adenosine deaminase in mitogen-stimulated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **93**, 286-291.
- Martín, M., Hugué, J., Centelles, J. J. and Franco, R. (1995). Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. *J. Immunol.* **155**, 4630-4643.
- Martin, P. L. and May, J. M. (1994). Identification and functional characterization of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors in the rat vas deferens: a comparison with A<sub>1</sub> receptors in guinea pig left atrium and A<sub>2</sub> receptors in guinea pig aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 1228-1235.
- Marullo, S., Nantel, F., Strosberg, A. D. and Bouvier, M. (1995). Variability in the regulation of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 126-129.
- Meghi, P. (1993). Storage, release, uptake, and inactivation of purines. *Drug Develop. Res.* **28**, 214-219.
- Meghji, P., Middleton, K., Hassall, C. J., Phillips, M. I. and Newby, A. C. (1988). Evidence for extracellular deamination of adenosine in the rat heart. *Int. J. Biochem.* **20**, 1335-1340.
- Mei, Y. A., Lefoll, F., Vaudry, H. and Cazin, L. (1996). Adenosine inhibits L-type and N-type calcium channels in pituitary melanotrophs. Evidence for the involvement of a G-protein in calcium channel gating. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 85-91.

- Meng, F., Xie, G-X., Chalmers, D., Morgan, C., Watson, S. J. and Akil, H. (1994). Cloning and characterization of a pharmacologically distinct A<sub>1</sub> adenosine receptor from guinea pig brain. *Mol. Brain Res.* **26**, 143-155.
- Miller, L. P. and Hsu, C. (1992). Therapeutic potential for adenosine receptor activation in ischemic brain injury. *J. Neurochem.* **2**, 5563-5577.
- Minelli, A., Allegrucci, C. and Mezzasoma, I. (1997). [<sup>3</sup>H]R-N-6-phenylisopropyladenosine agonist binding to the solubilized A<sub>1</sub> adenosine receptor from bovine epidymal spermatozoa. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 54-61.
- Mirabet, M., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1997, en prensa). Calcium mobilization in Jurkat cells via A<sub>2B</sub> adenosine receptors. *Br. J. Pharmacol.*
- Mittrücker, H-W., Steeg, C., Malissen, B., and Fleisher, B. (1995) The cytoplasmatic tail of the T cell receptor  $\zeta$  chain is required for signalling via CD26. *Eur. J. Immunol.* **25**, 295-297.
- Mogul, D. J., Adams, M. E. and Fox, A. P. (1993). Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron.* **10**, 327-334.
- Mohamedali, K. A., Kurz, L. C. and Rudolph, F. B. (1996). Site directed mutagenesis of active site glutamate 217 in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry.* **35**, 1672-1680.
- Moni, R. W., Romero, F. S. and Daly, J. W. (1995). The amphiphilic peptide adenoregulin enhances agonist binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors and [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S to brain membranes. *Cell. Mol. Neurobiol.* **15**, 465-493.
- Moos, W. H., Szotech, D. S. and Bruns, R. F. (1985). N<sup>6</sup>-Cycloalkyladenosines. Potent A<sub>1</sub>-selective adenosine agonists. *J. Med. Chem.* **28**, 1383-1384.
- Moyers, J. S., Linder, M. E., Shannon, J. D. and Parson, S. J. (1995). Identification of the in vitro phosphorylation sites on Gs $\alpha$  mediated by pp60<sup>c-src</sup>. *Biochem. J.* **305**, 411-417.
- Mudumbi, R. V., Montamat, S. C., Bruns, R. F. and Vestal, R. E. (1993). Cardiac functional responses to adenosine by PD 81723, an allosteric enhancer of the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Am. J. Physiol.* **264**, H1017-H1022.
- Müller, C. E. and Scior, T. (1993). Adenosine receptors and their modulators. *Pharmacol. Acta Helvet.* **68**, 77-111.
- Munshi, R. and Linden, J. (1989). Co-purification of A<sub>1</sub> adenosine receptors and guanine nucleotide-binding proteins from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **264**, 14853-14859.
- Munshi, R. and Linden, J. (1990). Interaction of purified bovine brain A<sub>1</sub> adenosine receptors with guanine nucleotide-binding proteins of human platelet membranes following reconstitution. *Mol. Pharmacol.* **38**, 170-176.

- Munshi, R., Pang, I-H., Sternweis, P. C. and Linden, J. (1991). A<sub>1</sub> adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub> and G<sub>0</sub>. *J. Biol. Chem.* **266**, 22285-22289.
- Murray, A. W. (1971). The biological significance of purine salvage. *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 811-820.
- Murthy, K. S. and Makhlof, G. M. (1995). Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated activation of phospholipase C-β<sub>3</sub> in intestinal muscle: dual requirement of α and βγ subunits of G<sub>i3</sub>. *Mol. Pharmacol.* **47**, 1172-1179.
- Murthy, K. S., Mchenry, L., Grider, J. R. and Makhlof, G. M. (1995). Adenosine A<sub>1</sub> and A<sub>2b</sub> receptors coupled to distinct interactive signaling pathways in intestinal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**, 300-306.
- Nagy, J.I. and Dadonna, P.E. (1985). Adenosine uptake sites in rat brain: identification using [<sup>3</sup>H]nitrobenzylthioinosine and co-localization with adenosine deaminase. *Neurosci. Lett.* **55**, 47-53.
- Nagy, J. I., Yamamoto, T., Uemura, H. and Schrader, W. P. (1996). Adenosine deaminase in rodent median eminence. Detection by antibody to the mouse enzyme and colocalization with adenosine deaminase complexing protein (CD26). *Neuroscience.* **73**, 459-471.
- Nair, V., Fasbender, A. J., Miller, L. P. and Bruce, J. L. (1991). High selectivity of novel isoguanosine analogues for the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 481-486.
- Nakamura, H., Koyama, G., Litaka, Y., Ohno, M., Yagisawa, N., Koudo, S., Maeda, K. and Umezawa, H. (1974). Structure of coformycin, an unusual nucleoside of microbial origin. *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 4327-4328.
- Nakata, H. (1992). Affinity chromatography in purification of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Chromatography.* **597**, 335-343.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell.* **80**, 249-257.
- Neubig, R. R. (1994). Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J.* **8**, 939-946.
- Ng, G. YK., Mouillac, B., George, S. R., Caron, M., Dennis, M., Bouvier, M. and O'Dowd, B. F. (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D<sub>1</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 7-19.
- Nguyen, T., Erb, L., Weisman, G. A., Marchese, A., Heng, H. H. Q., Garrad, R. C., George, S. R., Turner, J. T. and O'Dowd, B. F. (1995). Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J. Biol. Chem.* **270**, 30845-30848.
- Nicholls, J., Hourani, S. M. O. and Kitchen, I. (1992). Characterization of P<sub>1</sub>-purinoceptors on rat duodenum and urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 639-642.

- Nonaka, H., Mori, A., Ichimura, M., Shindou, T., Yanagawa, K., Shimada, J. and Kase, H. (1994). Binding of [<sup>3</sup>H]KF17837S, a selective adenosine A<sub>2</sub> receptor antagonist, to rat brain membranes. *Mol. Pharmacol.* **46**, 817-822.
- Nonaka, H., Ichimura, M., Takeda, M., Kanda, T., Shimada, J., Suzuki, F. and Kase, H. (1996). Kw-3902, a selective high-affinity antagonist for adenosine A<sub>1</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 1645-1652.
- Nyce, J. W. and Metzger, W. J. (1997). DNA antisense therapy for asthma in an animal model. *Nature.* **385**, 721-725.
- O'Connor, S. E., Dainty, I. A. and Leff, P. (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 137-141.
- Ogilvie, A., Lüthje, J., Pohl, U. and Busse, R. (1989). Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')-adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochem. J.* **259**, 97-103.
- Olah, M. E. (1997). Identification of A<sub>2a</sub> adenosine receptor domains involved in selective coupling to G<sub>s</sub>. *J. Biol. Chem.* **272**, 337-344.
- Olah, M. E., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1990). Purification and characterization of bovine cerebral cortex A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 440-446.
- Olah, M. E., Ren, H., Ostrowski, J., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1992). Cloning, expression, and characterization of the unique bovine A<sub>1</sub> adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **267**, 10764-10770.
- Olah, M. E., Gallo-Rodriguez, C., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1994a). <sup>125</sup>I-4-aminobenzyl-5'-N-methylcarboxamidoadenosine, a high affinity radioligand for the rat A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **45**, 978-982.
- Olah, M. E., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1994b). Role of the second extracellular loop of adenosine receptors in agonist and antagonist binding: Analysis of chimeric A<sub>1</sub>/A<sub>3</sub> adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **269**, 24692-24698.
- Olah, M. E. and Stiles, G. L. (1995). Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. *Ann. Rev. Pharmacol.* **35**, 581-606.
- Oppermann, M., Freedman, N. J., Alexander, R. W. and Lefkowitz, R. J. (1996). Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 13266-13272.
- Orozco, M., Canela, E. I. and Franco, R. (1989). Theoretical study of the protonation and tautomerization of adenosine, formycin, and their 2-NH<sub>2</sub> and 2-F derivatives. Functional implications in the mechanism of reaction of adenosine deaminase. *Mol. Pharmacol.* **35**, 257-264.

- Orozco, M., Canela, E. I. and Franco, R. (1990). A quantum chemical study of the enzymatic deamination of benzoadenine derivates. A theoretical model of the interactions occurring between nucleosides and the active site of adenosine deaminase. *Eur. J. Biochem.* **188**, 155-163.
- Osipchiuk, Y. and Cahalan, M. (1992). Cell-to-cell spread of calcium signals mediated by ATP receptors in mast cells. *Nature.* **359**, 241-244.
- Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Mutagenesis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. How structure elucidates function. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 167-183.
- Ozaki, n., Moroi, K., Kadota, T., Suzuki, S. and Kadota, K. (1994). Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors and their signal system present in coated vesicles prepared from bovine striatal tissue. *J. Neurochem.* **62**, 582-591.
- Padua, R., Geiger, J. D., Danbock, S. and Nagy, J. J. (1990). 2'-Deoxycoformycin inhibition of adenosine deaminase in rat brain in vivo and in vitro analysis of specific, potency and enzyme recovery. *J. Neurochem.* **54**, 1169-1178.
- Palczewski, K. and Benovic, J. L. (1991). G protein-coupled receptor kinase. *Trends Biol. Sci.* **16**, 387-391.
- Palczewski, K., Rispoli, G. and Detwiler, P. B. (1992). The influence of arrestin (48 kDa protein) and rhodopsine kinase on visual transduction. *Neuron.* **8**, 117-126.
- Palmer, M. P., Gettys, T. W., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1994). Desensitization of the canine A<sub>2a</sub> adenosine receptor: delineation of multiple processes. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1082-1094.
- Palmer, T. M. and Stiles, G. L. (1995). Adenosine receptors. *Neuropharmacol.* **34**, 683-694.
- Palmer, T. M., Benovic, J. L. and Stiles, G. L. (1996). Molecular basis for subtype-specific desensitization of inhibitory adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 15272-15278.
- Palmer, T. M. and Stiles, G. L. (1997). Identification of an A<sub>2a</sub> adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochemistry.* **36**, 832-838.
- Paton, D. M. and Kurahashi, K. (1981). Structure-activity relations for negative chronotropic action of adenosine in isolated rat atria: evidence for an action on A<sub>1</sub> adenosine receptors. *IRCS Med. Sci. Libr. Compend.* **9**, 447.
- Peachey, J. A., Brownhill, V. R., Hourani, S. M. O. and Kitchen, I. (1996). The ontogenetic profiles of the pre- and postjunctional adenosine receptors in the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 1105-1110.
- Pearse, B. M. F. (1988). Receptors compete for adaptors found in plasma membrane coated pits. *EMBO. J.* **7**, 3331-3336.

Pei, G., Kieffer, B. L., Lefkowitz, R. J. and Freedman, N. J. (1995). Agonist-dependent phosphorylation of the mouse  $\delta$ -opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol. Pharmacol.* **48**, 173-177.

Phillips, W. J., Wong, S. C. and Cerione, R. A. (1992). Rhodopsin/transducin interactions. Influence of the transducin- $\beta\gamma$  subunit complex on the coupling of the transducin- $\alpha$  subunit to rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **267**, 17040-17046.

Pierce, K. D., Furlong, T. J., Selbie, L. A. and Shine, J. (1992). Molecular cloning and expression of an adenosine receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 86-93.

Pintor, J., Torres, M. and Miras-Portugal, M. T. (1991). Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci.* **48**, 2317-2324.

Pintor, J., Rotllán P., Torres, M. and Miras-Portugal, T. (1992). Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal. Biochem.* **200**, 296-300.

Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (1997a). Dinucleotide receptor modulation by protein kinases (protein kinases A and C) and protein phosphatases in rat brain synaptic terminals. *J. Neurochem.* **68**, 2552-2557.

Pintor, J., Hoyle, C. H. V., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T. (1997b). Diadenosine polyphosphates in the central nervous system. *Neurosci. Res. Commun.* **20**, 69-78.

Pippig, S., Andexinger, S., Daniel, K., Puzicha, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lohse, M. J. (1993). Overexpression of  $\beta$ -arrestin and  $\beta$ -adrenergic receptor kinase augment desensitization of  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **268**, 3201-3208.

Pippig, S., Andexinger, S. and Lohse, M. J. (1995). Sequestration and recycling of  $\beta_2$ -adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**, 666-676.

Pitcher, J. A., Inglese, J., Higgins, J. B., Arriza, J. L., Casey, P. J., Kim, C., Benovic, J. L., Kwatra, M. M., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Role of  $\beta\gamma$  subunits of G proteins in targeting the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science.* **257**, 1264-1267.

Plagemann, P. G. W. and Woffendin C. (1988). Species differences in sensitivity of nucleoside transport in erythrocytes and cultured cells to inhibition by nitrobenzylthioinosine, dipyridamole, dilazep and lidoflazine. *Biochim. Biophys. Acta.* **969**, 1-8.

Plagemann, P. G. W., Wohlhueter, R. M and Woffendin, C. (1988). Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**, 405-443.

Post, S. R. and Brown, J. H. (1996). G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses. *FASEB. J.* **10**, 741-749.



- Prater, M. R., Taylor, H., Munshi, R. and Linden, J. (1992). Indirect effect of guanine nucleotides on antagonist binding to A<sub>1</sub> adenosine receptors: occupation of cryptic binding sites by endogenous vesicular adenosine. *Mol. Pharmacol.* **42**, 765-772.
- Premont, R. T., Inglese, J. and Lefkowitz, R. J. (1995). Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* **9**, 175-182.
- Protasoni, G., Castoldi, G., Busca, G., Panzacchi, G., Genovesi, S., Golin, R. and Stella, A. (1996). Effects of adenosine receptor agonists on renin release in anesthetized rats. *J. Hypertension.* **13**, 1753-1757.
- Pyne, N. J., Freissmuth, M. and Palmer S. (1992). Phosphorylation of the spliced variant forms of the recombinant stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein (G $\alpha$ ). *Biochem. J.* **285**, 333-338.
- Ramkumar, V., Pierson, G. and Stiles, G. L. (1988). In: *Progress in drug research*. pp 195-247. (Ed. Jucker). Birkhauser Verlag, Basel.
- Ramkumar, V., Olah, M. E., Jacobson, K. A. and Stiles, G. L. (1991). Distinct pathways of desensitization of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors in DDT<sub>1</sub>MF-2 cells. *Mol. Pharmacol.* **40**, 639-647.
- Ramkumar, V., Kwatra, M, Benovic, J. L. and Stiles, G. L. (1993). Functional consequences of A<sub>1</sub> adenosine receptor phosphorylation by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**, 89-97.
- Rao, R. V., Hadac, E. M., Roettger, B. F. and Miller, L. J. (1997a). Cholecystokinin-induced desensitization, receptor phosphorylation, and internalization in the CHP212 neuroblastoma cell line. *J. Neurochem.* **68**, 2356-2362.
- Rao, R. V., Roettger, B. F., Hadac, E. and Miller, L. J. (1997b). Roles of cholecystokinin receptor phosphorylation in agonist-stimulated desensitization of pancreatic acinar cells and receptor-bearing chinese hamster ovary cholecystokinin receptor cells. *Mol. Pharmacol.* **51**, 185-192.
- Raymond, J. R. (1991). Protein kinase C induces phosphorylation and desensitization of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 14747-14753.
- Raymond, J. R. and Olsen, C. L. (1994). Protein kinase A induces phosphorylation of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor and augments its desensitization by protein kinase C in CHO-K1 cells. *Biochemistry.* **33**, 11264-11269.
- Reddington, M., Alexander, S. P., Hoppe, E. and Kreutzberg, G. W. (1989). In: *Adenosine receptors in the nervous system*. pp 95-102. (Ed. J. A. Ribeiro). Taylor and Francis, London.
- Redman, R. S. and Silinsky, E. M. (1994). ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J. Physiol., London.* **477**, 117-127.

- Ren, H. and Stiles, G. L. (1994a). Characterization of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 3104-3110.
- Ren, H. and Stiles, G. L. (1994b). Posttranscriptional mRNA processing as a mechanism for regulation of human A<sub>1</sub> adenosine receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4864-4866.
- Ren, H. and Stiles, G. L. (1995). Separate promoters in the human A<sub>1</sub> adenosine receptor gene direct the synthesis of distinct messenger RNAs that regulate receptor abundance. *Mol. Pharmacol.* **48**, 975-980.
- Rivkees, S. A. (1995). Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology.* **135**, 2307-2313.
- Rivkees, S. A. and Reppert, S. M. (1992). RFL9 encodes an A<sub>2b</sub> adenosine receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1598-1604.
- Rivkees, S. A., Lasbury, M. E., Stiles, G. L., Henegariu, O., Curtis, C. and Vance, G. (1995a). The human A<sub>1</sub> adenosine receptor. Ligand binding, properties, sites of somatic expression and chromosomal localization. *Endocrine.* **3**, 623-629.
- Rivkees, S. A., Lasbury, M. E. and Barghaiya, H. (1995b). Identification of domains of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor that are important for binding receptor subtype-selective ligands using chimeric A<sub>1</sub>/A<sub>2a</sub> adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 20485-20490.
- Rodriguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M.T. (1988). Subcellular distribution studies of diadenosine poliphosphates- Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J. Neurochem.* **51**, 1696-1703.
- Rodriguez-Pascual, F., Torres, M., Rotllán, P. and Miras-Portugal, T. (1992). Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, Ap<sub>n</sub>A, by bovine chromaffin cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 176-183.
- Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Rao, Hadac, E. M., Larkin, J. M. and Miller, L. J. (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* **128**, 1029-1041.
- Roth, N. S., Campbell, P. T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lohse, M. J. (1991). Comparative rates of desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6201-6204.
- Rudolphi, K. A., Schubert, P., Parkinson, F. E. and Fredholm, B. B. (1992). Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 439-445.
- Ruiz, A., Sanz, J. M., Gonzalez-Calero, G., Fernandez, M., Andrés, A., Cubero, A. and Ros, M. (1996). Desensitization and internalization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat brain by in vivo treatment with R-PIA: involvement of coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1310**, 168-174.

- Salvatore, C. A., Jacobson, M. A., Taylor, H. E., Linden, J. and Johnson, R. G. (1993). Molecular cloning and characterization of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10365-10369.
- Sarges, R., Howard, H. R., Browne, R. G., Lebel, L. A., Seymour, P. A. and Koe, B. K. (1990). 4-amino (1,2,4)Triazolo (4, 3-A) quinoxalines. A novel class of potent adenosine receptor antagonists and potential rapid onset antidepressants. *J. Med. Chem.* **33**, 2240-2254.
- Sattin, A. and Rall, T. W. (1970). The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* **6**, 13-23.
- Schiemann, W. P., Walther, J. M. and Buxton, I. L. O. (1990). On the ability of endogenous adenosine to regulate purine nucleoside receptor binding of antagonists in smooth muscle membranes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **255**, 886-892.
- Schmidt, C. J., Thomas, T. C., Levine, M. A. and Neer, E. J. (1992). Specificity of G protein  $\beta$  and  $\gamma$  subunit interactions. *J. Biol. Chem.* **267**, 13807-13810.
- Schrader, W. P., Stacy, A. R. and Pollara, B. (1979). Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**, 4026-4032.
- Schrader, W. P. and Bryer, P. J. (1982). Characterization of an insoluble adenosine deaminase complexing protein from human kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **215**, 107- 112.
- Schrader, W. P., West, C. A. and Strominger, N. L. (1987). Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit brain. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 443-451.
- Schrader, W. P., West, C. A., Miczek, A. D. and Norton, E. K. (1990). Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction. *J. Biol. Chem.* **265**, 19312-19318.
- Schrader, W. P., West, C. A., Rudofsky, U. H. and Samsonoff, W. A. (1994). Subcellular distribution of adenosine deaminase and adenosine deaminase-complexing protein in rabbit kidney. Implication for adenosine metabolism. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 775-782.
- Schwabe, U., Kiffe, H., Puchstein, C. and Trost. (1979). Specific binding of [<sup>3</sup>H]adenosine to rat brain membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **310**, 59-67.
- Schwabe, U. and Trost, T. (1980). Characterization of adenosine receptors in rat brain by (-)[<sup>3</sup>H]N<sup>6</sup>-Phenylisopropiladenosine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **313**, 179-187.
- Sheldon, R. L., Bonasera, L. K. and Eichberg, J. (1996). Activation of adenosine A<sub>2</sub> receptors stimulates phosphoinositide metabolism in rat peripheral nerve. *J. Neurochem.* **66**, 613-619.
- Shin, Y., Daly, J. W. and Jacobson, K. A. (1997). Activation of phosphoinositide breakdown and elevation of intracellular calcium in a rat RBL-2H3 mast cell line by adenosine analogs. Involvement of A<sub>3</sub> adenosine receptors. *Drug Develop. Res.* **39**, 36-46.

- Showalter, H. D. H., Putt, S. R., Borondy, P. E. and Shillis, J. L. (1983). Adenosine-deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of (+/-)-3,6,7,8-tetrahydro-3-((2-hydroxyethyl) methyl) imidazo(4,5-D)(1,3)diazepin-(ol) and some selected C-5 homologs of pentostatin. *J. Med. Chem.* **26**, 1478-1482.
- Sibley, D. R., Strasser, R. H., Benovic, J. L., Daniel, K. and Lefkowitz, R. J. (1986). Phosphorylation/dephosphorylation of the  $\beta$ -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Sci. USA.* **83**, 9408-9412.
- Sideraki, V., Mohamedali, K. A., Wilson, D. K., Chang, Z. Y., Kellems, R. E., Quioco, F. A. and Rudolph, F. B. (1996). Probing the functional role of 2 conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry.* **35**, 7862-7872.
- Skladanowski, A. C. and Newby, A. C. (1990). Partial purification and properties of an AMP specific 5'-nucleotidase from pigeon heart. *Biochem. J.* **268**, 117-122.
- Smythe, E. and Warren, G. (1991). The mechanism of receptor-mediated endocytosis. *Eur. J. Biochem.* **202**, 689-699.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. and Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a  $G_A$  protein  $\beta\gamma$  dimer at 2.1 Å resolution. *Nature.* **379**, 369-374.
- Spielman, W. S. and Arend, L. J. (1991). Adenosine receptors and signaling in the kidney. *Hypertension.* **17**, 117-130.
- Spring, D. J. and Neer, E. J. (1994). A 14-amino acid region of the G protein  $\gamma$  subunit is sufficient to confer selectivity of  $\gamma$  binding to the  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 22882-22886.
- Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Lee, J. J., Weaver, D. R., Deeds, J. D. and Reppert, S. M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel  $A_2$ -adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* **6**, 384-393.
- Stein, H., Schwarting, R. and Niedobitek, G. (1989). In: *Leukocyte typing IV*. pp 412-415 (Eds. Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W. R.). Oxford University Press.
- Stiles, G. L. (1986). Photoaffinity cross-linked  $A_1$  adenosine receptor-binding subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 10839-10843.
- Stiles, G. L. (1992). Adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 6451-6454
- Stone, G. A., Jarvis, M. F., Sills, M. A., Weeks, B., Snowhill, E. W. and William, M. (1988). Species differences in high-affinity adenosine  $A_2$  binding sites in striatal membranes from mammalian brain. *Drug. Dev. Res.* **15**, 31-46.
- Strader, C. D., Fong, T. M., Tota, M. R. and Underwood, D. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132.

- Tanaka, T., Camerini, D., Seed, B., Torimoto, Y., Dang, N. H., Kameoka, J., Dahlberg, H. N., Schlossman, S. F. and Morimoto, C. (1992). Cloning and functional expression of the cell activation antigen CD26. *J. Immunol.* **149**, 481-486.
- Tholanikunnel, B. G., Granneman, J. G. and Malbon, C. C. (1995). The Mr 35,000  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA-binding protein binds transcripts of G protein-linked receptors which undergo agonist-induced destabilization. *J. Biol. Chem.* **270**, 12787-12793.
- Thorn, J. A. and Jarvis, S. M. (1996). Adenosine transporters. *Gen. Pharmac.* **27**, 613-620.
- Tischfield, J. A., Creagan, R. P., Nichols, E. A. and Ruddle, F. H. (1974). Assignment of a gene for adenosine deaminase to human chromosome 20. *Hum. Hered.* **24**, 1-11.
- Tokunaga, T., Katsuragi, T., Sato, C. and Furukawa, T. (1995). ATP release evoked by isoprenaline from adrenergic nerves of guinea pig atrium. *Neurosci. Lett.* **186**, 95-98.
- Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, T., Schlossman, S. F. and Morimoto, C. (1991). Coassociation of CD26 (Dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human lymphocytes T. *J. Immunol.* **147**, 2514-2517.
- Townsend-Nicholson, A. and Schofield, P. R. (1994). A threonine residue in the seventh transmembrane domain of the human A<sub>1</sub> adenosine receptor mediates specific agonist binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 2373-2376.
- Trams, E. G. and Lauter, C. J. (1975). Adenosine deaminase of cultured brain cells. *Biochem. J.* **152**, 681-687.
- Trivedi, B. K., Bridges, A. J., Patt, W. C., Priebe, S. R. and Bruns, R. F. (1989). N<sup>6</sup>-Bicycloalkyladenosines with unusually high potency and selectivity for the adenosine A<sub>1</sub> receptor. *J. Med. Chem.* **32**, 8-11.
- Trotta, P. P. (1982). Identification of a membrane adenosine deaminase binding protein from human placenta. *Biochemistry.* **21**, 4014-4023.
- Trotta, P. P., Peterfreund, R. A., Schonberg, R. and Balis, M. E. (1979). Rabbit adenosine deaminase conversion proteins. Purification and characterization. *Biochemistry.* **18**, 2953-2959.
- Trussel, L. O. and Jackson, M. B. (1985). Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4857-4861.
- Tsuga, H., Kameyama, K., Haga, T., Kurose, H. and Nagao, T. (1994). Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. *J. Biol. Chem.* **51**, 32522-32527.
- Ulmer, A., Mattern, T., Feller, A., Heymann, E. and Flad, H. D. (1990). CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4ELIC 7. *Scand. J. Immunol.* **31**, 429.

- Ungerer, J. P. J., Oosthuizen, H. M., Bissbort, S. H. and Vermaak, W. J. H. (1992). Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin. Chem.* **38**, 1322-1326.
- Valenzuela, A., Blanco, J., Callebaut, C., Jacotot, E., Lluís, C., Hovanessian, A. G. and Franco, R. (1997). Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. *J. Immunol.* **158**, 3721-3729.
- Van Calker, D., Muller, M. and Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **33**, 999-1005.
- Van der Weyden, M. B. and Kelley, W. N. (1976). Human adenosine deaminase; distribution and properties. *J. Biol. Chem.* **251**, 5448-5456.
- Van Koppen, C. J., Lenz, W., Nunes, P. L., Zhang, C., Schmidt, M. and Jakobs, K. H. (1995). The role of membrane proximal threonine residues conserved among guanine-nucleotide-binding-protein-coupled receptors in internalization of the m4 muscarinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* **234**, 536-541.
- Vargeese, C., Sarma, M. S. P., Pragnacharyulu, P. V. P. Abushanab, E., Li, S. Y. and Stoeckler, J. D. (1997). Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of putative metabolites of (+)-erithro-9-(2S-hidroxy-3R-nonyl)adenine. *J. Med. Chem.* **37**, 3844-3849.
- Vendite, D., Sanz, J. M., López-Alañón, D. M., Vacas, J. Andrés, A. and Ros, M. (1998). Desensitization of adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* **23**, 211-218.
- Vijayalakshmi, D. and Belt, J. A. (1988). Sodium dependent nucleoside transport in mouse intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 19419-19423.
- Vives-Corrons, J. L., Rozman, C., Pujades, M. A., Colomer, D., Pérez-Vila, E., Amegon, I., Gallart, T., Vives-Puigros, J., Viñolas, N. and Montserrat, E. (1988). Combined assay of adenosine deaminase, purine nucleoside phosphorylase and lactate dehydrogenase in the early clinical evaluation of B-chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* **263**, F428-487.
- Von Kügelgen, I., Aligater, C., Schobert, A. and Starke, K. (1994). Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neuroscience.* **61**, 199-202.
- Von Zastrow, M. and Kobilka, B. K. (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosome containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 3530-3538.
- Wakamiya, M., Blackburn, M. R., Jurecic, R., McArthur, M. J., Geske, R. S., Cartwright, J., Mitani, K., Vaishnav, S., Belmont, J. W., Kellems, R. W., Finegold, M. J., Montgomery, C. A., Bradley, A. and Casey, C. T. (1995). Disruption of the adenosine-deaminase gene causes hepatocellular impairment and perinatal lethality in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3673-3677.

- Wang, C-Z., Namba, N., Gono, T., Inagaki, N. and Seino, S. (1996). Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 196-202.
- Watson, A. J., Katz, A. and Simon, M. I. (1994). A fifth member of the mammalian G-protein  $\beta$ -subunit family. *J. Biol. Chem.* **269**, 22150-22156.
- Weaver, D. R. (1996). A<sub>1</sub> adenosine receptor gene expression in fetal rat brain. *Develop. Brain Res.* **94**, 205-223.
- Webb, T. E., Henderson, D., King, B. F., Wang, S., Simon, J., Bateson, A. N., Burnstock, G. and Barnard, E. A. (1996a). A novel G protein-coupled P<sub>2</sub> purinoceptor (P<sub>2Y3</sub>) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol. Pharmacol.* **50**, 258-265.
- Webb, T. E., Kaplan, M. G. and Barnard, E. A. (1996b). Identification of 6H1 as a P<sub>2Y</sub> purinoceptor: P<sub>2Y5</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 105-110.
- Westphal, R. S., Backstrom, J. R. and Sanders-Bush, E. (1995). Increased basal phosphorylation of the constitutively active serotonin 2C receptor accompanies agonist-mediated desensitization. *Mol. Pharmacol.* **48**, 200-205.
- White, T. D., Bourke, J. E. and Livett, B. G. (1987). Direct and continuous detection of ATP secretion from primary monolayer cultures of bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **49**, 1266-1273.
- Wiginton, D. A., Kaplan, D. J., States, J. C., Akeson, A. L., Perme, C. M., Bilyk, I. J., Vaighn, A. J., Lattier, D. L. and Hutton, J. J. (1986). Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. *Biochemistry.* **25**, 8234-8244.
- Williams, M. and Risley, E. A. (1980). Biochemical characterization of putative central purinergic receptors by using 2-chloro [<sup>3</sup>H]adenosine, a stable analog of adenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 6892-6896.
- Williams, T. C., Doherty, A. J., Griffith, D. A. and Jarvis S. M. (1989). Characterization of sodium-dependent and sodium-independent nucleoside transport systems in rabbit brush-border and basolateral plasma-membrane vesicles from the renal outer cortex. *Biochem. J.* **264**, 223-331.
- Williams, T. C. and Jarvis, S. M. (1991). Multiple sodium-dependent nucleoside transport system in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochem. J.* **274**, 27-33.
- Wilson, D. K., Rudolph, F. B. and Quioco, F. A. (1991). Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science.* **252**, 1278-1284.
- Wilson, D. K. and Quioco, F. A. (1993). A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochemistry.* **32**, 1689-1694.

- Windscheif, U. (1996). Purinoceptors : from history to recent progress. A review. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 993-1011.
- Wolfensen, L. and Frick, L.(1986). Mechanisms of enzyme action and inhibition-transition-state analogs for acid-base catalysis. *J. Prot. Chem.* **5**, 147-155.
- Wu, P. H. and Phillis J. W. (1978). Distribution and release of adenosine triphosphate in rat brain. *Neurochem. Res.* **3**, 563-571.
- Wu, P. H. and Phillis, J. W. (1982). Adenosine receptors in rat brain membranes: characterization of high affinity binding of [<sup>3</sup>H]-2-chloroadenosine. *Int. J. Biochem.* **14**, 399-402.
- Wu, X., Yuang, 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. *J. Biol. Chem.* **267**, 8813-8818.
- Yamada, M., Hamamori, Y, Akita, H. and Yokoyama, M. (1992). P<sub>2</sub>-purinoceptor activation stimulates phosphoinositide hydrolysis and inhibits accumulation of cAMP in cultured ventricular myocytes. *Cir. Res.* **70**, 477-485.
- Yamane, H. K. and Fung, B. K.-K. (1993). Covalent modification of G-proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Sci.* **32**, 201-241.
- Yamazaki, Y., Truong, V. L. and Lowenstein, J. M. (1991). 5'-nucleotidase I from rabbit heart. *Biochemistry.* **30**, 1503-1509.
- Yang, J., Logsdon, C. D., Johansen, T. E. and Williams, J. A. (1993). Human m3 muscarinic acetylcholine receptor carboxyl-terminal threonine residues are required for agonist-induced receptor down-regulation. *Mol. Pharmacol.* **44**, 1158-1164.
- Yao, S. Y. M., Ng A. M. L., Mabel, W. L., Ritzel, W. L., Gati, W. P., Cass, C. E. and Young, J. D. (1996). Transport of adenosine by recombinant-selective sodium/nucleoside cotransporters from rat jejunum expressed in xenopus laevis oocytes. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1529-1535.
- Yaron, A. and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31.
- Yeung, C-Y, Ingolia, D. E., Roth, D. B., Shoemaker, C., Al-Ubaidi, M. R., Yen, J-Y, Ching, C., Bobonis, C., Kaufman, R. J. and Kellems, R. E. (1985). Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 10299-10307.
- Yeung, S. M. H., Pérez-Rey, E. and Cooper, D. M. F. (1987). Hydrodynamic properties of adenosine R<sub>i</sub> receptor solubilized from rat cerebral cortical membranes. *Biochem. J.* **248**, 635-642.
- Yu, S. S., Lefkowitz, R. J. and Hausdorff. (1993). β-adrenergic receptor sequestration. *J. Biol. Chem.* **268**, 337-341.



- 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 A<sub>3</sub> adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 7432-7436.
- Zhu, P. J. and Krnjevic, K. (1997). Endogenous adenosine on membrane properties of CA1 neurons in rat hippocampal slices during normoxia and hypoxia. *Neuropharmacol.* **36**, 169-176.
- Ziganshin, A. U., Hoyle, C. H. V. and Burnstock, G. (1994). Ecto-enzymes and metabolism of extracellular ATP. *Drug Develop. Res.* **32**, 134-146.
- Zimmermann, H. (1992). 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285**, 345-365.
- Zimmermann, H. (1996). Biochemistry. Localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **49**, 589-618.
- Zocchi, C., Ongini, E., Ferrara, S., Baraldi, P. G. and Dionisotti, S. (1996). Binding of the radioligand [<sup>3</sup>H] SCH-58261, a new nonxantine A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonist, to rat striatal membranes. *Br. J. Pharmacol.* **117**, 1381-1386.