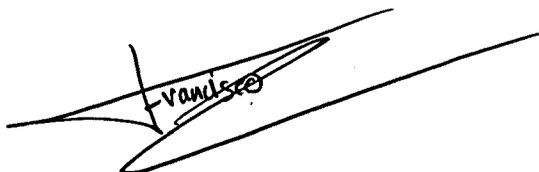


**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES**  
**FACULTAT DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

**INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS  
EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ADENOSINA.**

Memoria presentada por el  
Licenciado en Biología  
**FRANCISCO CIRUELA ALFÉREZ**  
para optar al grado de  
Doctor en Biología

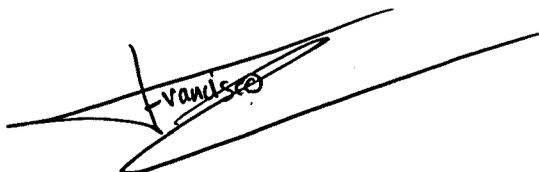
A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco', is written over a large, sweeping horizontal stroke that underlines the text above.

Barcelona, Noviembre de 1995.

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**DIVISIÓ DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS I MATEMÀTIQUES**  
**FACULTAT DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

**INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS  
EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ADENOSINA.**

Memoria presentada por el  
Licenciado en Biología  
**FRANCISCO CIRUELA ALFÉREZ**  
para optar al grado de  
Doctor en Biología

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco', is written over a large, sweeping horizontal stroke that underlines the text above.

Barcelona, Noviembre de 1995.

**INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS  
EN EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE ADENOSINA.**

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Francisco Ciruela Alférez bajo la dirección del Dr. Enric I. Canela i Campos y la Dra. Josefa Mallol i Montero en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona

Barcelona, Noviembre de 1995



Dr. Enric I. Canela i Campos



Dra. Josefa Mallol i Montero

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral no podría haber sido realizado sin la ayuda y el apoyo en todo momento de la gente que me ha rodeado tanto en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular como fuera de él, por este hecho quiero expresar mi gratitud a:

Enric Canela y Pepi Mallol, mis directores, por el apoyo científico y personal que me han ofrecido en todo momento.

Carme Lluís y Rafael Franco, por su eterna disposición y ofrecimiento a la discusión científica, sin la cual hubiera sido muy difícil mantener el rumbo de la investigación.

Julià Blanco ("Julián"), por abrirme la puerta de la ciencia y mantener siempre abierta la puerta de la amistad.

Àngels Navarro, por su gran amistad y su consejo científico.

Maribel Mirabet, Rafael Zapata ("Rafaé"), Ana López, Margarita Martín, Joan Sayós, Josep Centelles, Vicent Casadó, y Carolina, por hacer más amena y divertida la investigación científica.

Carles Saura y Agustín Valenzuela ("Valentín"), por permanecer siempre dispuestos a dar amistad cuando más se necesita, por ser compañeros infatigables de trabajo en los últimos años, por muchas cosas más, y como no, por la gran inspiración demostrada los viernes por la tarde en el bar.

Silvia, Marisol, y Sara, por la tremenda paciencia que han tenido conmigo en la fase final de la elaboración de esta Tesis.

Bertil Fredholm y todos los miembros de su laboratorio, por el humor y entusiasmo científico demostrado durante mi estancia en el Karolinska Institutet.

Manolo y compañía, por hacer más llevadero el día en el laboratorio, incluso cuando los ánimos no estaban muy altos.

Senen Vilaró y Susana Castel, por iniciarme en el mundo de la citología y microscopía confocal.

Los miembros del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

Mis familiares, por haberme inspirado siempre a ver las cosas desde un ángulo diferente.

Elena, por el amor, paciencia y cariño sin el cual me hubiera sido muy difícil continuar hacia adelante en muchas ocasiones, y por haber pagado el pato algunas veces.

A Elena

A mis padres

*Las preguntas que no tienen respuesta  
son las que determinan las posibilidades del ser humano,  
son las que trazan la existencia del hombre..*

## ABREVIATURAS

ABA	N <sup>6</sup> -4-aminobenciladenosina
ABMECA	N <sup>6</sup> -4-aminobencil-5'metilcarboxamidoadenosina
ABOPX	3-(4-aminofenil)-8-(4-oxiacetatofenil)-1-propilxantina
ADA	Adenosina desaminasa
ADAbp	Proteína de unión de adenosina desaminasa
ADO	Adenosina
ADP	5'-difosfato de adenosina
AHPIA	R-2-azido-N <sup>6</sup> -p-hidroxifenilisopropiladenosina
AMP	5'-monofosfato de adenosina
AMPc	3',5'-monofosfato de adenosina
AMPS	adenilosuccinato
ANAPP <sub>3</sub>	Arilazidopropionil 5'-trifosfato de adenosina
APNEA	N <sup>6</sup> -2-(4-aminofenil)etiladenosina
ATP	5'-trifosfato de adenosina
αβMATP	5'-(α, β-metilen)trifosfato de adenosina
2-SATP	5'-(2-metiltio)trifosfato de adenosina
AzBA	N <sup>6</sup> -(4-azidobencil)adenosina
AzPNEA	N <sup>6</sup> -(4-azidofenil)-etiladenosina
AZT	3'-azido-3'-deoxitimidina
βARK	Qinasa del receptor β-adrenérgico
BBM	Brush Border Membranes, membranas de epitelio tapizado
BL	Basolateral Membranes, membranas basolaterales
BW-A827U	3-(4-aminofenil)-8-(4-oxiacetatofenil)-1-propilxantina
BW-A844U	3-(4-aminofenil)-8-ciclopentil-1-propilxantina
CADO	2-cloroadenosina
CCPA	2-cloro-N <sup>6</sup> -ciclopentiladenosina
CGS15943	5-amino-9-cloro-2-(2-furanil)-1,2,4-triazolo [1,5-c]quinazolina
CGS21680	2-[p-(2-carboxietil)feniletilamino]-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
CHA	N <sup>6</sup> -ciclohexiladenosina
CHAPS	3-[3-(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CHC	8-ciclohexilcafeína
p-CMBS	p-cloromercuriofenil sulfonato
CPA	N <sup>6</sup> -ciclopentiladenosina
8-CPT	8-ciclopentilteofilina
CTX	Toxina del cólera
CV1808	2-fenilaminoadenosina
DAG	Diacilglicerol
DCF	2'-desoxicoformicina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DPCPX	1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina
DTT	Ditiotreitol
EDRF	Factor relajante dependiente de endotelio
EHNA	9-(eritro-2-hidroxi-3 nonil)adenina
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FICT	Isotiocianato -de fluoresceína
GDP	5'-difosfato de guanosina

GLUT-1	Transportador de glucosa equilibrativo
GMP	5'-monofosfato de guanosina
GMPc	3',5'-monofosfato de guanosina
Gpp(NH)p	5'-difosfato de guanililimida
GTP	5'-trifosfato de guanosina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IABOPX	3-(3-yodo-4-aminofenil)-8-(4-oxiacetatofenil)-1-propilxantina
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IC <sub>50</sub>	Concentración de un producto que produce el 50% de inhibición
IMP	5'-monofosfato de inosina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
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
KW-3902	(8-(noradamantan-3-il)-1,3-dipropilxantina
5'N	5' nucleotidasa
NAD <sup>+</sup>	Nicotín-adenín-dinucleótido
NADP <sup>+</sup>	Nicotín-adenín-dinucleótido fosfato
NBTG	Nitrobenciltioguanosina.
NBTI	Nitrobenciltioinosina
NECA	5'-N-etilcarboxamidoadenosina
NEM	N-etilmaleimida
NGF	Factor de crecimiento neural
NT	Transportador nucleosídico
PAPA-APEC	2-[4-[2-[2-[(4aminofenil)metilcarbonilamino]etilaminocarbonil]etil]fenil]etilamino-5'-N-etilcarboxamidoadenosina
PIA	N <sup>6</sup> -fenilisopropiladenosina
PKC	Proteína quinasa C
PKA	Proteína quinasa A
8-PT	8-fenilteofilina
PTX	Toxina pertussis
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SANPAH	N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato
-SH	Residuo sulfhidrilo
SDS	Dodecilsulfonato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
S-ENBA	1R,2S,4S-2-endo-norbormiladenosina
SGLT1	Cotransportador Na <sup>+</sup> -glucosa
SNST1	Transportador concentrativo de nucleósidos denominado
8-SPT	8-p-sulfofenilteofilina
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
UTP	5'-trifosfato de uridina
V <sub>max</sub>	Capacidad máxima de transporte
XAC	8(4-[[[(2-aminoetil)amino]carbonil]metil]-oxi]fenil)-1,3-dipropilxantina
XMP	5'-monofosfato de xantina

## ÍNDICE

PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS. ....	I
<b>A. INTRODUCCIÓN.</b> .....	3
<b>A.1. LA ADENOSINA Y LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA COMO REGULADORES DEL FUNCIONAMIENTO CELULAR.</b> .....	3
<i>A.1.1. Producción, metabolismo, liberación y eliminación de purinas.</i> .....	3
<i>A.1.2. Efectos fisiológicos de las purinas.</i> .....	5
<i>A.1.3. Las purinas como mensajeros extracelulares: Perspectiva Histórica.</i> ..	7
<b>A.2. EL TRANSPORTE NUCLEOSÍDICO.</b> .....	8
<i>A.2.1. El transporte de nucleósidos por difusión simple.</i> .....	8
<i>A.2.2. El transporte de nucleósidos por difusión facilitada o equilibrativo.</i> ..	9
<i>A.2.2.1. El transportador sensible a NBTI.</i> .....	9
<i>A.2.2.2. El transportador insensible a NBTI.</i> .....	10
<i>A.2.2.3. Purificación y caracterización molecular del transportador nucleosídico equilibrativo: relación con el transportador de azúcares.</i> .....	11
<i>A.2.2.4. Regulación y expresión del transportador nucleosídico equilibrativo.</i> .....	13
<i>A.2.3 El transporte nucleosídico activo o concentrativo.</i> .....	15
<b>A.3 LA ACCIÓN CATABÓLICA DE LA ADENOSINA DESAMINASA.</b> ..	16
<i>A.3.1 Caracterización cinética de la adenosina desaminasa.</i> .....	16
<i>A.3.2 Caracterización molecular de la adenosina desaminasa y de su proteína de unión.</i> .....	17
<i>A.3.3 Distribución y función biológica de la adenosina desaminasa.</i> .....	19
<b>A.4 LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS.</b> .....	20
<i>A.4.1. Purinoreceptores <math>P_2</math> o receptores de ATP.</i> .....	20
<i>A.4.2. Purinoreceptores <math>P_3</math> o receptores de ATP y adenosina.</i> .....	21
<i>A.4.3. Purinoreceptores <math>P_1</math> o receptores de adenosina.</i> ..	23
<i>A.4.3.1. Clasificación de los receptores de adenosina.</i> .....	23
<i>A.4.3.2. Estudios estructura actividad.</i> .....	26
<i>A.4.3.2.1. Agonistas de los receptores de adenosina.</i> .....	26
<i>A.4.3.2.2. Antagonistas de los receptores de adenosina.</i> .....	29
<i>A.4.3.3. Caracterización bioquímica y biología molecular de los receptores de adenosina.</i> .....	31
<i>A.4.3.4. Distribución tisular de los receptores de adenosina.</i> ..	35
<i>A.4.3.5. Sistemas efectores acoplados a los receptores de adenosina</i> ...	37
<i>A.4.4. Transmisión de la señal a través de los receptores acoplados a las proteínas G.</i> .....	37
<i>A.4.4.1. Proteínas heterotriméricas que unen GTP.</i> .....	39

A.4.4.2. <i>Modificación, combinación y función de las subunidades <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> y <math>\gamma</math>.</i>	42
A.4.5. <i>Regulación de los receptores acoplados a proteína G.</i>	44
A.4.5.1. <i>Desensibilización de la capacidad de transmisión de señal.</i>	45
A.4.5.2. <i>Secuestro de los receptores acoplados a proteína G.</i>	46
A.4.5.3. <i>Down-regulation de los receptores acoplados a proteína G.</i>	48
<b>B. RESULTADOS.</b>	51
B.1. <i>Solubilization and molecular characterization of the nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes.</i>	51
B.1.1. <i>Abstract.</i>	53
B.1.2. <i>Introduction.</i>	53
B.1.3. <i>Materials and methods.</i>	54
B.1.4. <i>Results.</i>	56
B.1.5. <i>Discussion.</i>	60
B.1.6. <i>References.</i>	61
B.2. <i>Regulation of the nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine uptake by cultured kidney cells.</i>	63
B.2.1. <i>Abstract.</i>	65
B.2.2. <i>Introduction.</i>	65
B.2.3. <i>Materials and methods.</i>	66
B.2.4. <i>Results.</i>	67
B.2.5. <i>Discussion.</i>	70
B.2.6. <i>References.</i>	73
B.3. <i>Immunological identification of <math>A_1</math> adenosine receptors in brain cortex.</i>	75
B.3.1. <i>Abstract.</i>	77
B.3.2. <i>Introduction.</i>	77
B.3.3. <i>Materials and methods.</i>	78
B.3.4. <i>Results.</i>	81
B.3.5. <i>Discussion.</i>	83
B.3.6. <i>References.</i>	86
B.4. <i>Adenosine deaminase interacts with <math>A_1</math> adenosine receptors in pig brain cortical membranes.</i>	89
B.4.1. <i>Abstract.</i>	91
B.4.2. <i>Introduction.</i>	91
B.4.3. <i>Materials and methods.</i>	92
B.4.4. <i>Results.</i>	95
B.4.5. <i>Discussion.</i>	98
B.4.6. <i>References.</i>	100

<i>B.5. Adenosine deaminase affects signalling by interacting with cell surface adenosine receptors.</i>	103
<i>B.5.1. Abstract.</i>	105
<i>B.5.2. Introduction.</i>	105
<i>B.5.3. Materials and methods.</i>	105
<i>B.5.4. Results and discussion.</i>	106
<i>B.5.6. References.</i>	111
<i>B.6. Ligand-induced clustering and desensitization of A<sub>1</sub> adenosine receptors. Involvement of Ser/Thr phosphorylation.</i>	113
<i>B.6.1. Summary.</i>	115
<i>B.6.2. Introduction.</i>	115
<i>B.6.3. Materials and methods.</i>	116
<i>B.6.4. Results.</i>	121
<i>B.6.5. Discussion.</i>	125
<i>B.6.6. References.</i>	127
<b><u>C. DISCUSIÓN.</u></b>	131
<b><u>D. CONCLUSIONES.</u></b>	141
<b><u>E. BIBLIOGRAFÍA.</u></b>	143



## **PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS**

En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto el importante papel regulador de algunos metabolitos que, además de intervenir en el metabolismo energético celular, poseen una función extracelular como autocoideas al interactuar con receptores específicos de la membrana. En este sentido, la adenosina y los nucleótidos derivados de la misma son un claro ejemplo de metabolitos capaces de ejercer una acción hormonal en la mayoría de tejidos. Esta tesis doctoral se enmarca dentro de este campo y pretende dar una visión de los sistemas responsables de la variación de la concentración de la adenosina extracelular, así como de los mecanismos que intervienen en su interacción con los receptores específicos.

En el momento de iniciar este trabajo experimental, el grupo de investigación en el que se ha integrado esta tesis, había demostrado la existencia de enzimas encargadas de producir y degradar adenosina en la membrana luminal de tubuladura renal de cerdo. Ello permitía predecir la aparición transitoria de este autoicoide como producto del metabolismo nucleotídico extracelular. La adenosina generada en el medio extracelular puede ejercer sus efectos vía dos sistemas diferentes: uno es la acción directa sobre sus receptores específicos, mientras que el otro es su transporte hacia el interior celular, contribuyendo así a la recuperación de nucleósidos purínicos. Ambos aspectos constituían dos líneas de investigación de interés para nuestro equipo y por ello se propusieron como el objetivo fundamental de esta tesis doctoral.

La consecución del objetivo global requería de estrategias bien diferenciadas. Para la caracterización molecular del transportador de nucleósidos, el cual interviene en la liberación y/o captación de la adenosina extracelular, la estrategia empleada ha sido la solubilización del transportador presente en vesículas de membrana de túbulo proximal de riñón de cerdo y la determinación de sus características mediante la unión de un inhibidor específico (nitrobenziltioimosina, NBTI) tritiado que, además, posee la capacidad de unirse covalentemente al transportador por acción de la luz ultravioleta de alta energía. El modelo de membranas renales aisladas, aunque óptimo para la caracterización de la unión de [<sup>3</sup>H]NBTI al transportador, es evidentemente limitado para otro tipo de estudios, como puede ser la regulación del transporte. Para llevar a cabo esta investigación se buscaron modelos más próximos a las condiciones *in vivo*, que permitieran estudios de regulación por fosforilación del transportador. Se han empleado cultivos primarios de células epiteliales de riñón de cerdo, así como células LLC-PK1 que son una línea epitelial derivada de túbulo proximal de riñón de cerdo.

El segundo objetivo de esta tesis, fue la caracterización de los receptores que interactúan con la adenosina, demostrando así su actividad como autoicoide. Se han descrito cuatro subtipos de receptores de adenosina: A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> y A<sub>3</sub>. Aunque casi todos ellos se expresan en distintas zonas del riñón, las BBM renales de cerdo y la línea celular LLC-PK1 presentan muy baja afinidad por cualquiera de los ligandos agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptores descritos, por lo que constituyen un sistema muy deficiente para estudiar receptores de adenosina desde el punto de vista farmacológico. La necesidad de emplear otras herramientas en la caracterización molecular de receptores impuso como objetivo primordial de esta tesis el desarrollo de anticuerpos que permitieran detectar la expresión de los receptores sin la necesidad de determinar la unión de radioligandos. En el momento que se planteó esta necesidad sólo se había clonado el receptor A<sub>1</sub> de adenosina, por lo que se abordó la obtención de anticuerpos anti-peptídicos contra el receptor A<sub>1</sub> de adenosina.

La obtención y caracterización de anticuerpos anti-peptídicos contra el receptor  $A_1$  ha constituido un reto importante ya que no se había logrado la obtención de anticuerpos anti-peptídicos de ningún receptor de la familia de receptores acoplados a proteína-G. Ello ha motivado que la caracterización de los anticuerpos se haya realizado en sistemas modelo donde se conocía la expresión elevada de receptor  $A_1$  funcional, como en corteza cerebral de cerdo y en la línea celular DDT<sub>1</sub>MF-2 de musculatura lisa de hamster. Durante el proceso de caracterización de los anticuerpos anti- $A_1$ R en estos sistemas, se han establecido tres hechos que consideramos de especial importancia. Uno es la existencia de una forma dimérica del receptor. Otro es que la ecto-adenosina desaminasa (enzima que metaboliza adenosina en el medio extracelular) es capaz de interactuar con el receptor  $A_1$  (interacción proteína-proteína) y facilitar tanto la unión de ligandos como la transducción de la señal. En tercer lugar, hemos puesto de manifiesto que los receptores  $A_1$  de adenosina, en el proceso de desensibilización por saturación con el agonista, sufren un proceso de agregación en la superficie celular que está mediado por un proceso de fosforilación en ser/thr del receptor.

Los resultados presentados son, pues, una aportación al conocimiento global de la existencia y papel que desempeña la adenosina en el medio extracelular. Estos datos, aunque no sean directamente extrapolables a otros sistemas, pueden representar una gran ayuda en la interpretación de los efectos, muchas veces contradictorios, de la adenosina.

## **A. INTRODUCCIÓN.**



## **A. INTRODUCCIÓN.**

### **A.1. LA ADENOSINA Y LOS NUCLEÓTIDOS DE ADENINA COMO REGULADORES DEL FUNCIONAMIENTO CELULAR.**

Los nucleósidos y nucleótidos de purina juegan un papel fundamental en el funcionamiento celular, son intermediarios de rutas metabólicas, actuando al mismo tiempo como principal fuente de energía celular (ATP). Aparecen en procesos metabólicos celulares como constituyentes de los cofactores necesarios para las reacciones enzimáticas, tales como las reacciones de oxidación-reducción (deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}$ ), o las de metilación en las que se emplea como fuente de metilos la S-adenosilmetionina (SAM) (Arch et al., 1978). También juegan un papel importante en la replicación celular (Alberts et al., 1983), pues se encuentran formando parte, junto con las pirimidinas, de la estructura del DNA y RNA.

El estudio de las purinas estuvo restringido durante muchos años a su metabolismo intracelular; sin embargo, la existencia de receptores extracelulares de nucleótidos (ATP) y nucleósidos (adenosina), puesto de manifiesto en las últimas décadas, ha despertado un mayor interés por el estudio de las funciones reguladoras autocoides de los nucleótidos y nucleósidos de purinas.

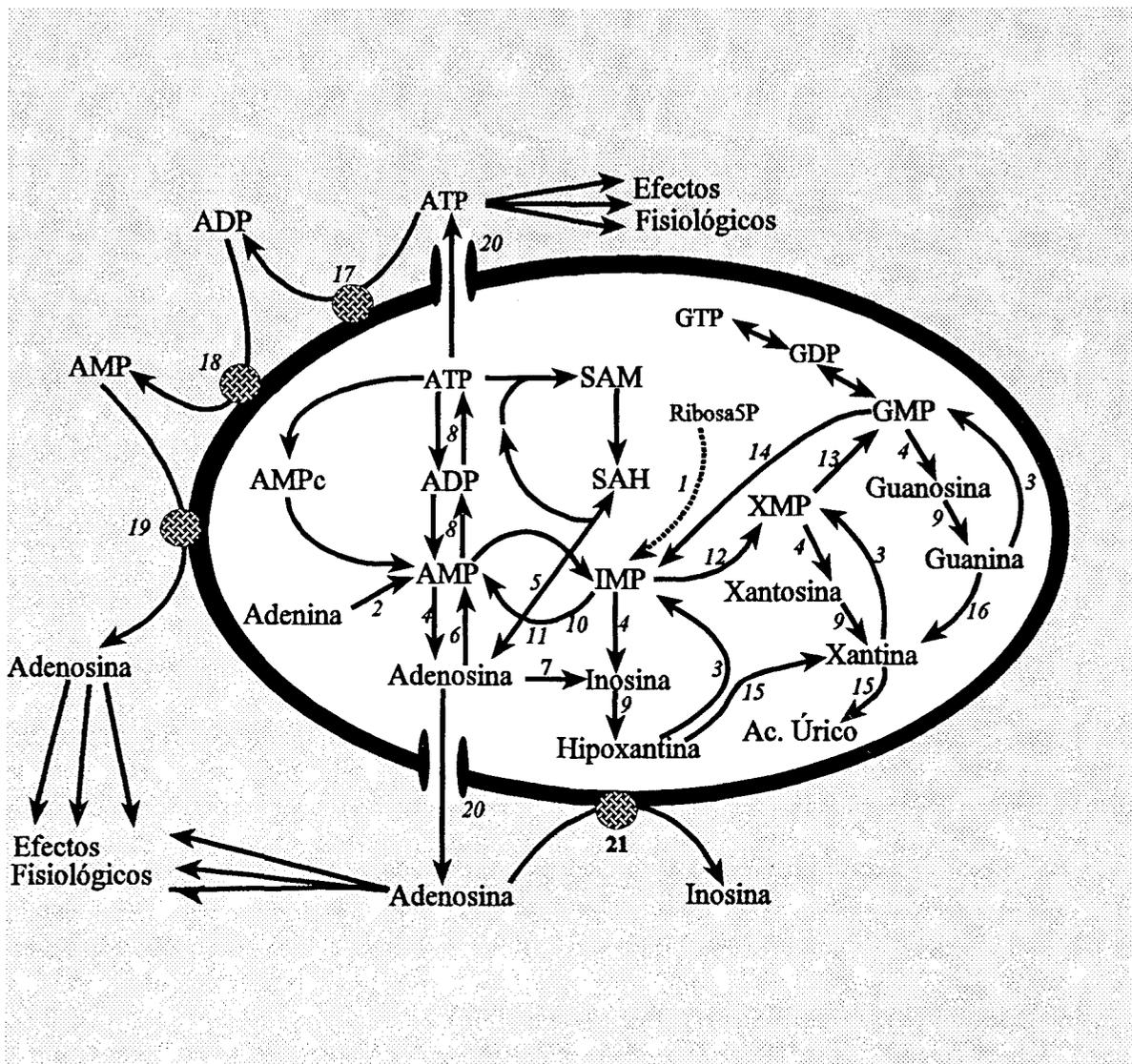
#### *A.1.1. Producción, metabolismo, liberación y eliminación de purinas.*

Muchas células animales son capaces de cubrir sus requerimientos purínicos única y exclusivamente a partir de procesos anabólicos, es decir, a través de rutas metabólicas que implican una síntesis *de novo* de purinas a partir de precursores no purínicos (ribosa-5-P, glutamina, glicina y ácido aspártico) y mediante una secuencia lineal de diez reacciones que dan lugar a la formación de IMP (1, Figura 1). Sin embargo, algunas células animales, tales como las de la médula ósea, la mucosa intestinal, los leucocitos, los eritrocitos y determinadas células del cerebro, carecen por completo de las rutas metabólicas de biosíntesis *de novo* de purinas, por lo tanto, son absolutamente dependientes de las purinas generadas por otras células (Murray, 1971). Las purinas provienen principalmente de otros tejidos tales como el hígado, y en menor medida a través de los aportes que provienen de la dieta. Los eritrocitos, si bien no poseen una síntesis *de novo* de purinas, pueden actuar como reservorio en la transferencia neta de purinas desde el hígado hasta los tejidos dependientes (Plagemann, 1986).

Si bien no todas las células poseen la ruta metabólica de síntesis *de novo* de purinas, sí se ha descrito en todas las células un mecanismo de recuperación de purinas donde intervienen dos enzimas, las cuales implican el paso de adenina a AMP (2, Figura 1) y el de hipoxantina a IMP respectivamente (3, Figura 1). La ruta de recuperación de purinas representa un considerable ahorro de energía para la célula (1 mol ATP/1 mol IMP sintetizado), mientras que la síntesis *de novo* de purinas resulta bastante más cara hablando en términos energéticos (5 moles ATP/1 mol IMP sintetizado), con lo cual, esta última sólo tendrá lugar cuando el estado energético de la célula sea elevado (Zimmer et al., 1973).

Una vez generado el IMP por la vía de síntesis *de novo*, o AMP, IMP, XMP y GMP por la ruta de recuperación de las purinas, estos nucleótidos constituyen el centro de las principales rutas de producción, metabolismo, liberación y eliminación de la adenosina que se ilustra esquemáticamente en la figura 1. La adenosina se produce principalmente por la degradación de ATP, a pesar de que pequeñas cantidades de adenosina pueden ser generadas a partir de S-adenosilhomocisteína. Una vez generada, la adenosina puede ser liberada al exterior celular por

transporte a través de transportadores nucleosídicos, o por el contrario, puede ser fosforilada para generar AMP. Otra posibilidad, consiste en que la adenosina reaccione con la L-homocisteína y formase S-adenosilhomocisteína. Finalmente, tanto la adenosina intracelular como la extracelular son desaminadas por la adenosina desaminasa, generándose como resultado inosina.



- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| 1. Biosíntesis de novo.                     | 11. Adenilosuccinato liasa.     |
| 2. Adenina-fosforibosil transferasa.        | 12. IMP deshidrogenasa.         |
| 3. Hipox.-guanina-fosforibosil transferasa. | 13. GMP sintetasa.              |
| 4. 5'-nucleotidasa.                         | 14. GMP reductasa.              |
| 5. S-adenosilhomocisteína hidrolasa.        | 15. Xantina oxidasa.            |
| 6. Adenosina quinasa.                       | 16. Guanina desaminasa.         |
| 7. Adenosina deaminasa.                     | 17. Ecto-ATPasa.                |
| 8. Adenilato quinasa.                       | 18. Ecto-adenosina difosfatasa. |
| 9. Purino-nucleósido fosforilasa.           | 19. Ecto-5' nucleotidasa.       |
| 10. Adenilosuccinato sintetasa.             | 21. Ecto-adenosina desaminasa.  |

Figura 1. Ilustración esquemática de la generación y metabolismo de la adenosina.

La adenosina se puede generar intracelularmente por defosforilación directa del AMP como resultado de la acción de la 5'-nucleotidasa (4) (Collinson et al., 1987) o por hidrólisis de la S-adenosilhomocisteína por una hidrolasa específica (5) (De La Haba and Cantoni 1959). La adenosina generada por estos dos mecanismos puede entonces entrar en dos posibles rutas metabólicas: la primera consiste en una fosforilación catalizada por la adenosina quinasa (6) para generar AMP, y la segunda implica una desaminación de la molécula como resultado de la acción de la adenosina desaminasa (7), rindiendo una molécula de inosina (Arch and Newsholme 1978). El AMP puede ser fosforilado en dos etapas por la adenilato quinasa (8) para generar finalmente ATP. Por otro lado, la inosina puede convertirse de nuevo en AMP a través de la ruta de reciclado o de recuperación de purinas. En esta ruta, la inosina sufre una defosforilación por la acción de una purino-nucleósido fosforilasa (9) para generar hipoxantina y ribosa 1-fosfato. Una vez obtenida la hipoxantina, ésta es transformada en IMP por la hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (3). El IMP resultante, mediante la acción de la adenilosuccinato sintetasa (10) y liasa (11) promueve la generación de AMP. Por otro lado, este IMP, por la acción de la IMP deshidrogenasa (12), puede generar XMP, el cual puede ser transformado por la GMP sintetasa (13) en GMP. Finalmente, el GMP puede volver a IMP por la acción de la GMP reductasa (14). La hipoxantina puede ser sustrato de la xantina deshidrogenasa o xantina oxidasa (15) para generar xantina, la cual también se puede obtener a partir de guanina por la acción de la guanina deaminasa (16), finalmente esta xantina rinde ácido úrico, lo que constituye la ruta catabólica de estos nucleósidos.

La S-adenosilhomocisteína hidrolasa no es tan sólo una posible fuente de producción de adenosina; también sirve como una proteína de unión de adenosina a nivel intracelular (adenosine-binding protein) (Hershfield and Kredich 1978; Olsson 1978). Se ha demostrado que en determinados tejidos más del 90% de la adenosina intracelular se encuentra unida a la S-adenosil homocisteína hidrolasa (Olsson et al., 1982). La función fisiológica de este fenómeno está aún por dilucidar.

El catabolismo extracelular del ATP proporciona adenosina que puede ser transportada al interior celular por transportadores específicos. En este proceso, el ADP se genera a partir de ATP por la acción de una ecto-ATPasa (17), y el AMP y adenosina vía una ecto-adenosina difosfatasa (18) y una ecto-5'-nucleotidasa (19) respectivamente (Pearson et al., 1980). La adenosina es liberada al medio extracelular principalmente a través de transportadores nucleosídico específicos (NT) que se encuentran en la membrana plasmática de la célula (20) (Young and Jarvis 1983; Geiger and Fyda 1991). La adenosina extracelular puede ser metabolizada a inosina por la acción de una ecto-adenosina desaminasa (21) (Aran et al., 1991).

#### *A.1.2. Efectos fisiológicos de las purinas.*

Las purinas, además de producirse en la gran mayoría de las células del organismo, ejercen una gran influencia en el correcto funcionamiento de prácticamente todos los órganos (Gordon 1986; Dubyak and Fedan 1990; Olsson and Pearson 1990; Williams 1990; Imai and Nakazawa 1991). Los efectos más conocidos de la adenosina (Tabla I) incluyen la inhibición de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Phillis et al., 1979) y la inhibición de la lipólisis. Posee efectos cronotrópicos e ionotrópicos negativos en el corazón (Evans et al., 1982), dilata determinados vasos sanguíneos tales como los presentes en el corazón y cerebro, así como en la mayoría de tejidos (excepto en el riñón), lo que produce un incremento en el aporte de oxígeno (Berne et al., 1983). El efecto inhibitorio de la adenosina sobre la agregación plaquetaria puede también considerarse como favorecedor del riego sanguíneo. Por otra parte, la adenosina también ejerce

un importante papel como regulador de la función respiratoria y posee un efecto sedante. Todos los efectos fisiológicos descritos anteriormente están dirigidos de una u otra manera a la regulación del aporte y del consumo local de oxígeno, intentando contrarrestar de esta manera los estados de hipoxia (Bruns et al., 1988).

<u>TEJIDO.</u>	<u>EFEECTO FISIOLÓGICO.</u>	<u>REFERENCIAS.</u>
<b>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.</b>		
	Inhibición actividad motora espontanea.	<i>Snyder et al., 1981.</i>
	Sedación	<i>Maitre et al., 1974.</i>
	Antiansiolítico.	<i>Williams et al., 1981..</i>
	Anticonvulsivo.	<i>Dunwiddie and Worth, 1982.</i>
	Antidepresivo.	<i>Rosen et al., 1985.</i>
	Hiperalgnesia.	<i>Gold et al., 1980.</i>
	Inhibición liberación neurotransmisores.	<i>Vizi and Knoll, 1976.</i>
<b>SISTEMA CARDIOVASCULAR.</b>		
	Vasodilatación.	<i>Raberger et al., 1977.</i>
	Inhibición agregación plaquetaria.	<i>Cusack and Hourani, 1981.</i>
	Inhibición ritmo cardíaco.	<i>Berne, 1963.</i>
	Inhibición conducción aurícula-ventrículo.	<i>Belardinelli et al., 1989.</i>
<b>RIÑÓN.</b>		
	Vasoconstricción.	<i>Hedqvist et al., 1978.</i>
	Descenso flujo filtración glomerular.	<i>Spielman and Arennd, 1991.</i>
	Contracción células mesangiales.	<i>Olivera et al., 1989.</i>
	Antidiuresis.	<i>Kuan et al., 1993.</i>
	Modulación liberación renina.	<i>Tagawa and Vander, 1970.</i>
<b>SISTEMA INMUNE.</b>		
	Inhibición generación superóxidos.	<i>Cronstein et al., 1990.</i>
	Activación mediadores alérgicos.	<i>Ramkumar et al., 1993.</i>
	Inhibición función linfocitos T.	<i>Wolberg et al., 1978.</i>
<b>APARATO RESPIRATORIO.</b>		
	Broncodilatación.	<i>Krazanowski et al., 1987.</i>
	Broncoconstricción.	<i>Ramkumar et al., 1993</i>
	Modulación secreción mucosa.	<i>Johnson et al., 1985.</i>
<b>APARATO GASTRO-INTESTINAL</b>		
	Disminución ingestión.	<i>Glowa and Spealman, 1984.</i>
	Inhibición secreción ácida.	<i>Glavin et al., 1987.</i>
<b>HÍGADO.</b>		
	Estimulación captación glucosa.	<i>Raberger et al., 1980.</i>
<b>TEJIDO ADIPOSO.</b>		
	Inhibición lipolisis.	<i>Trost and Stock, 1977.</i>
	Estimulación oxidación glucosa.	<i>Souness and Hagoya, 1981</i>
<b>PÁNCREAS.</b>		
	Potenciación liberación glucagón.	<i>Petrack et al., 1981.</i>
<b>ADRENALES.</b>		
	Estimulación síntesis esteroides.	<i>Londos et al., 1980.</i>

Tabla I. Efectos fisiológicos de la adenosina.

### *A.1.3. Las purinas como mensajeros extracelulares: Perspectiva Histórica.*

El que las purinas actúen como mensajeros extracelulares y sean capaces de inducir respuestas fisiológicas se demostró por primera vez en 1929, cuando Drury y Szent-Györgyi demostraron que la administración por vía sanguínea de adenosina y AMP disminuye la presión sanguínea arterial, reduce el ritmo cardíaco y afecta a las funciones renales y respiratorias (Drury and Szent-Györgyi 1929). Pocos años más tarde, Lindner and Rigler (1931) demostraron que la adenosina es un potente dilatador de los vasos coronarios, por lo cual postularon que la adenosina debía ser un regulador del flujo sanguíneo. Esta hipótesis recibió un fuerte apoyo en 1963 cuando se demostró que la adenosina es liberada por el tejido cardíaco en condiciones de carencia de oxígeno o hipoxia (Berne 1963; Gerlach et al., 1963). Basándose en todos estos estudios, se sugirió que la adenosina podía tener un papel importante como modulador, el cual es liberado cuando las demandas de oxígeno aumentan y el suministro del mismo es insuficiente. Por otro lado, y aunque no definitivamente demostrado, la adenosina es a menudo considerada como "metabolito autoregulatorio" (Newby 1984), en el sentido que por sí misma aumenta la captación de oxígeno y disminuye el consumo del mismo, y en este sentido disminuye su propia formación.

Un gran avance en el conocimiento del papel de la adenosina tuvo lugar al demostrarse en preparaciones de cerebro que la adenosina es liberada como consecuencia de un estímulo eléctrico (Pull and McIlwain 1972). Esta adenosina induce un aumento de los niveles intracelulares del AMPc, que es antagonizado por metilxantinas tales como la cafeína y la teofilina (Kakiuchi et al., 1968; Sattin and Rall 1970), de la misma manera que sucede en corazón (De Gubareff and Sleator 1965). Esta fue la primera evidencia que sugería que la adenosina ejerce sus efectos vía receptores específicos. Años más tarde, se observó que el efecto antilipolítico de la adenosina en las células del tejido adiposo tiene lugar simultáneamente con una disminución de los niveles de AMPc intracelulares (Ebert and Schwabe 1973; Fain 1973; Trost and Stock 1977). Estos efectos duales de la adenosina sobre la formación de AMPc fueron firmemente corroborados cuando se demostró que la adenosina puede actuar bidireccionalmente en la inhibición o activación de la adenilato ciclasa. Esta observación condujo a la primera subclasificación de los receptores de adenosina en  $R_i$  y  $R_a$  (Londos et al., 1980) o, de forma alternativa, como  $A_1$  y  $A_2$  (Van Calker et al., 1979). Por otro lado, también se demostró que la adenosina puede unirse directamente a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa e inhibir su actividad enzimática (Londos and Wolff 1977; Trost and Stock 1977; Haslam et al., 1978). En este último caso, el agonismo presentado por la adenosina es dependiente de la presencia o no del anillo purínico y no se requiere la parte ribosídica de la misma, este tercer "receptor" se denominó "P-site". El significado fisiológico de este centro de unión de adenosina permanece aún oscuro, en parte debido a que se requieren elevadas concentraciones de adenosina (entre micromolar y milimolar) para lograr su activación.

Paralelamente, se demostró que el ATP es el causante de importantes efectos cardiovasculares (Green and Stoner 1950), que puede ser liberado tras un estímulo nervioso (Holton and Holton 1954) y que puede inducir una vasodilatación en determinados sistemas (Holton and Holton 1954). Sin embargo, el establecimiento del papel funcional de los nucleótidos purínicos no llegó hasta 1970 cuando Burnstock sugirió la tercera división del sistema nervioso autónomo, la que él denominaría la transmisión nerviosa purinérgica. El sistema purinérgico es descrito como un sistema de transmisión nerviosa no colinérgico y no adrenérgico.

En esta hipótesis se postuló que el ATP podría actuar como neurotransmisor en algunos nervios no-adrenérgicos y no-colinérgicos, los denominados nervios purinérgicos, y que además actuaría como cotransmisor junto a la noradrenalina, la acetilcolina y otros neurotransmisores. Por

este motivo, se sugirió que el ATP sería el principal mediador de los efectos periféricos gobernados por este sistema nervioso purinérgico (Burnstock et al., 1970; Su et al., 1971; Burnstock 1972). Burnstock argumentó que las respuestas mediadas por el ATP son distintas de las mediadas por la adenosina (Burnstock 1976), proponiendo dos clases de receptores purinérgicos: los receptores  $P_1$  capaces de mediar las respuestas fisiológicas de la adenosina, y los receptores  $P_2$  encargados de mediar las respuestas al ATP (Burnstock 1978). En la actualidad, está firmemente establecido que el ATP es una molécula-señal que actúa a nivel extracelular (Gordon 1986; O'Connor et al., 1991) y empleando técnicas farmacológicas, al menos han sido propuestos seis tipos diferentes de receptores para nucleótidos purínicos ( $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2U}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2Z}$  y  $P_{2D}$ ).

## **A.2 EL TRANSPORTE NUCLEOSÍDICO.**

En numerosos tipos celulares se ha descrito la existencia de sistemas de transporte específicos para nucleósidos. Los factores determinantes que implican la presencia de estos transportadores en dichas células responden a varias causas. En primer lugar, ciertas células, como eritrocitos, neuronas o células del tracto intestinal, son deficientes en la biosíntesis de novo de purinas y pirimidinas, y por tanto, su supervivencia depende de la captación de estos compuestos. En segundo lugar, existen células que presentan la capacidad de transportar ciertos metabolitos de unos compartimentos a otros; un ejemplo son determinadas células renales que tienen como principal función la reabsorción de diferentes compuestos, entre ellos los nucleósidos, para ser reutilizados por el organismo. En tercer lugar, la existencia de receptores de adenosina y la presencia en el espacio extracelular de enzimas del metabolismo purínico extracelular en la mayoría de tipos celulares, precisa de un mecanismo de translocación de nucleósidos entre el interior y el exterior celular que colaboraría en el control de las concentraciones extracelulares de estos compuestos. Todas estas razones, no sólo justifican, sino que hacen realmente necesario un transportador de nucleósidos en las células animales.

En las células, cualquier fenómeno de transporte implica la transferencia de un sustrato a través de una membrana celular, y tiene lugar por tres mecanismos diferentes: la difusión simple, la difusión facilitada y el transporte activo.

### *A.2.1. El transporte de nucleósidos por difusión simple.*

La difusión simple de un compuesto a través de una bicapa lipídica es, por definición, no concentrativa, insaturable al aumentar la concentración de sustrato, no inhibible por inhibidores específicos y bidireccional; el proceso depende únicamente de la hidrofobicidad y el tamaño de la molécula a transportar. Por supuesto, este tipo de transporte no requiere la existencia de una proteína transportadora, mostrando una alta dependencia de la temperatura.

La difusión simple de la adenosina es cuantitativamente una ruta minoritaria debido a la naturaleza hidrofílica de la adenosina, que ofrece, por lo tanto, una gran resistencia al paso a través de una bicapa lipídica (membrana plasmática). La velocidad de paso de los nucleósidos por sí solos a través de la membrana, sería insuficiente para aportar los requerimientos nucleosídicos en el crecimiento celular. La permeabilidad que presentan los nucleósidos por difusión simple es como máximo el 5% de la permeabilidad de los mismos en el caso de la difusión facilitada.

### A.2.2. El transporte de nucleósidos por difusión facilitada o equilibrativo.

El transporte pasivo por difusión facilitada es también un proceso no concentrativo y bidireccional, por lo tanto, es un proceso equilibrativo. A diferencia de la difusión simple, la difusión facilitada requiere la presencia en la membrana plasmática de una proteína responsable de la translocación del sustrato, es por lo tanto un proceso saturable al aumentar la concentración de sustrato e inhibible por inhibidores específicos.

El transporte de adenosina a través de proteínas transportadoras es un proceso bastante rápido. Mediante estudios cinéticos de la incorporación de nucleósidos a diferentes células se detecta la presencia de un sistema de transporte nucleosídico por difusión facilitada o equilibrativo de gran capacidad, amplia especificidad de sustrato y reversible. El sistema es ubicuo, se describe en la totalidad de tipos celulares animales. La respuesta de este sistema a la inhibición por el análogo nucleosídico nitrobenciltioinosina (NBTI) (6-([4-nitroencil]tio)-9- $\beta$ -D-ribofuranosilpurina) permite la subdivisión de este tipo de transporte en dos formas: una forma denominada sensible a NBTI (inhibible por concentraciones nanomolares de NBTI) y una forma resistente a NBTI (inhibible únicamente a concentraciones micromolares de NBTI). Basándose en este hecho, Crawford and Belt proponen una nomenclatura para los transportadores nucleosídicos. Según estos autores la forma sensible a NBTI recibe el nombre de transportador *es* (equilibrativo y sensible a NBTI) y la forma no sensible a NBTI se denomina transportador *ei* (equilibrativo e insensible a NBTI) (Crawford and Belt, 1991). La distribución de ambos tipos de transporte es variable en función del tipo celular y de la especie estudiada.

Por otro lado, los transportadores de nucleósidos presentan una serie de preferencias de sustrato las cuales constituyen otra base para su clasificación.

#### A.2.2.1. El transportador sensible a NBTI.

El NBTI (Figura 2A), un potente inhibidor del transporte de adenosina y otros nucleósidos en determinados tipos celulares, se une con alta afinidad ( $K_D < 5$  nM) a los centros de unión en la membrana plasmática, los cuales están funcionalmente asociados con (o son parte de) los sistemas de transporte nucleosídico de difusión facilitada en determinadas células. Los centros de unión de alta afinidad para el NBTI son los causantes del bloqueo del transporte nucleosídico en los sistemas NBTI-sensitivos (Jarvis and Young, 1980). Esta hipótesis está avalada por diferentes evidencias experimentales: la  $K_D$  de la unión del NBTI en estos centros de alta afinidad es aproximadamente del mismo orden que la constante de inhibición por NBTI del transporte nucleosídico ( $K_i < 2$  nM) (Plagemann and Wohlhueter, 1980; Griffith et al., 1992; Doherty and Jarvis, 1993). Por otro lado, el tiempo necesario para la unión del NBTI a los centros de alta afinidad y el necesario para alcanzar la inhibición del transporte son aproximadamente los mismos (Young and Jarvis, 1983).

Diversos derivados nucleosídicos, relacionados estructuralmente con el NBTI, son también potentes inhibidores del transporte nucleosídico. Entre ellos se incluyen los 9- $\beta$ -D-pentofuranósidos de 6-tiopurinas, como por ejemplo la nitrobenciltioguanosina (NBTG), así como los sustituyentes bencilicos en S<sup>6</sup>- y N<sup>6</sup>- del anillo de adenina de la molécula de adenosina, como por ejemplo la N<sup>6</sup>-(p-azidobencil)adenosina (Figura 2A) (Paterson et al., 1983). Actualmente, está totalmente demostrado que es el grupo lipofílico nitrobencilo de que el transportador muestre una afinidad  $10^6$  mayor por el NBTI que por los nucleósidos naturales. Dicho grupo parece interactuar con una zona altamente hidrofóbica de la molécula del transportador.

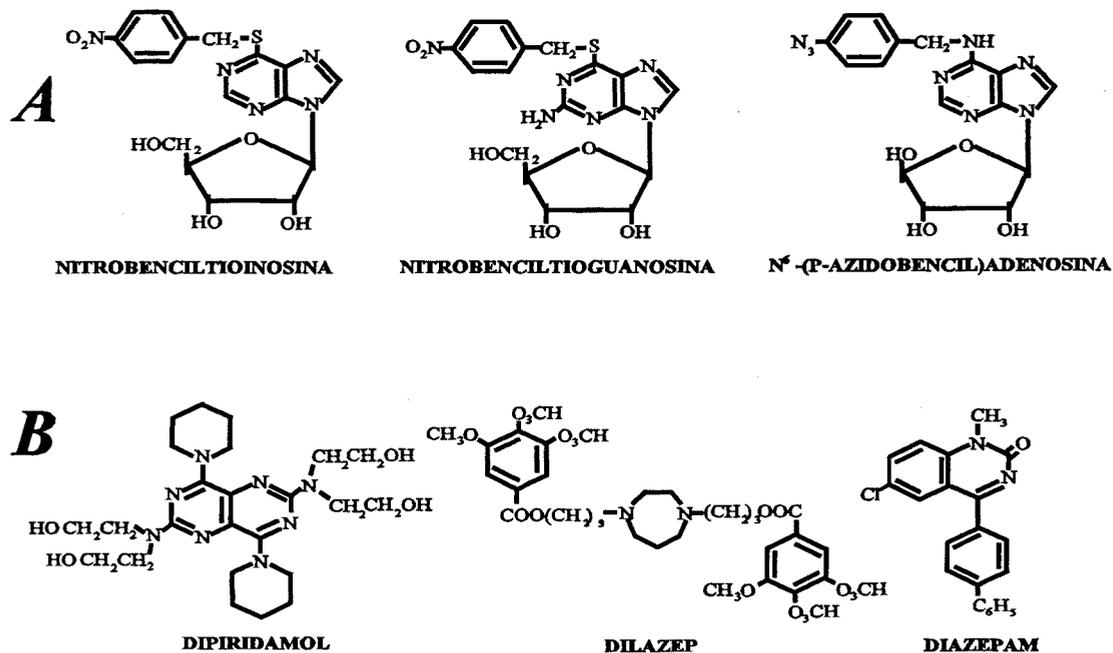


Figura 2. Estructura de los inhibidores del transporte nucleosídico equilibrativo. Relacionados (A) y no relacionados (B) estructuralmente con la adenosina.

Distintos fármacos no nucleosídicos, entre los que destacan el dipiridamol, el dilazep y el diazepam (Figura 2B), son también potentes inhibidores del transporte nucleosídico (Kolassa et al., 1971; Miras-Portugal et al., 1986; Jarvis et al., 1983). El centro de unión y el modo de acción de estos inhibidores no-nucleosídicos sobre los transportadores nucleosídicos sensibles a NBTI aún está por dilucidar. Lo que sí se conoce es que, sorprendentemente, en una misma preparación de membranas, el dipiridamol presenta mayor densidad de centros de unión que el NBTI. Otra observación es que estos inhibidores muestran una variabilidad de comportamiento entre diferentes especies animales que presentan  $K_m$  similares para los nucleósidos naturales; este hecho sugiere la existencia de componentes de membrana adyacentes al transportador que podrían formar parte de los centros de unión de los mencionados inhibidores.

#### A.2.2.2. El transportador insensible a NBTI.

La presencia en la célula de sitios de unión de alta afinidad para el NBTI siempre se había asociado a la existencia de transportadores para la adenosina y otros nucleósidos (Williams et al., 1989). Así, en eritrocitos el 100 % del transporte de adenosina corre a cargo de transportadores nucleosídicos sensibles a NBTI (Jarvis and Martin, 1986). Sin embargo, esta presunción ha de ser cuidadosamente analizada, puesto que se ha observado que algunos tipos celulares (Novikoff rat hepatoma o Walker 256 rat carcinoma) únicamente expresan un transportador de nucleósidos totalmente insensible a NBTI (Belt, 1983; Plagemann and Wohlhueter, 1985), el denominado tipo *ei*, para el cual la constante de inhibición del transporte nucleosídico que posee el NBTI ( $K_i$ ) es superior a 1 mM. Sin embargo, la gran mayoría de líneas celulares expresan ambos tipos (tipos

*es* y *ei*), aunque en proporciones muy variables.

En un tipo celular modelo, podríamos encontrar que la curva dosis respuesta para la inhibición del transporte de adenosina por NBTI es bifásica; donde aproximadamente el 35 % del transporte es inhibido, con un valor de  $IC_{50}$  de aproximadamente de 0.25 nM, mientras que un 65% del transporte permanece insensible a concentraciones más altas de 1 mM. Paralelamente a estos estudios de inhibición del transporte, se han realizado estudios de la sensibilidad de ambos sistemas de transporte (*es* y *ei*) frente a un determinado compuesto químico organomercurial impermeable, el *p*-cloromercuriofenil sulfonato (*p*-CMBS). El transportador de nucleósidos insensible a NBTI es inhibido por *p*-CMBS con una  $IC_{50}$  en el intervalo de micromolar, mientras que a una concentración de 1 mM no se ejerce ningún efecto sobre el transportador sensible a NBTI en células intactas. La inhibición ejercida por el *p*-CMBS es revertida por ditioneitol y  $\beta$ -mercaptoetanol, de la misma manera que la adenosina y uridina protegen de la inhibición ejercida por este compuesto. Ésto sugiere la presencia de un grupo tiol en el centro activo de reconocimiento de nucleósidos en el transportador no sensible a NBTI (Tse et al., 1985; Plagemann and Woffendin, 1984).

La entidad bioquímica de estos dos tipos de transporte es actualmente un motivo de controversia, puesto que funcionalmente los dos transportadores son lo suficientemente similares como para sugerir que ambos representan el producto de dos genes relativamente próximos, o que por el contrario, representan dos conformaciones distintas de una única proteína; una capaz de unir NBTI y la otra no. Estudios inmunológicos recientes (Kwong et al., 1992) parecen confirmar la segunda hipótesis, pues demuestran una gran homología entre los transportadores equilibrativos, independientemente de su sensibilidad a NBTI.

#### *A.2.2.3. Purificación y caracterización molecular del transportador nucleosídico equilibrativo: relación con el transportador de azúcares.*

El transportador de nucleósidos equilibrativo sensible a NBTI (forma *es*) ha sido purificado a partir de eritrocitos humanos (Jarvis and Young, 1981) por el mismo procedimiento que el empleado para el aislamiento del transportador de azúcares presente en estas mismas células (Wheeler and Hinkle, 1985). El método de purificación estaba basado en la carga iónica del transportador y rendía grados de purificación de entre 10 y 15 veces. En las fracciones de purificado, el transportador no representaba más del 3% de las proteínas presentes, mientras que el transportador de azúcares constituía el 70% de las mismas (Rampal et al., 1986). Gracias a los ensayos de fotomarcado con [ $^3H$ ]NBTI el transportador de nucleósidos ha sido identificado como una glicoproteína de membrana heterogéneamente glicosilada, ofreciendo un peso molecular de entre 45 y 65 kDa, dependiendo del tamaño de las cadenas de oligosacáridos, la cual puede llegar a representar el 15% del peso molecular total de la proteína (Lienhard et al., 1984). El transportador de nucleósidos no sólo se co-purifica sino que también co-migra con el transportador de glucosa equilibrativo (GLUT-1) cuando se realiza una separación proteica por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Kwong et al., 1986).

Más recientemente, el transportador de nucleósidos equilibrativo ha sido purificado casi a homogeneidad mediante una cromatografía de intercambio iónico seguida de una cromatografía de inmunofinidad con anticuerpos dirigidos contra el transportador de glucosa, este último paso permite la eliminación de la proteína mayoritaria que se co-purifica conjuntamente con el transportador de nucleósidos en la cromatografía de intercambio iónico (Kwong et al., 1988). El transportador purificado ha sido empleado para generar anticuerpos policlonales (Kwong et al., 1992) capaces de reconocer el transportador presente en humanos, cerdo, conejo y rata, lo cual

indica que las secuencias peptídicas están bastante relacionadas. Estos estudios inmunológicos han revelado que los transportadores equilibrativos, independientemente de su sensibilidad a NBTI, presentan una gran homología en el sentido que pueden ser reconocidos por el mismo tipo de anticuerpos policlonales. Esta evidencia apoya la idea de que la molécula responsable de ambos tipos de transporte (el sensible a NBTI o forma *es* y el insensible a NBTI o forma *ei*) proviene del mismo gen y que son pequeñas diferencias estructurales en la molécula las que proporcionan las diferencias. Por otro lado, no se puede descartar la hipótesis de que se trate de dos moléculas diferentes con una elevada analogía estructural y que sean codificadas por genes diferentes.

Se han empleado estudios de digestión enzimática con tripsina y endoglicosidasa-F para analizar las diferencias moleculares que se presentan entre el transportador de nucleósidos fotomarcado con [<sup>3</sup>H]NBTI en diferentes especies de mamíferos (humano, cerdo, cobaya y rata) y en diferentes tejidos de las mismas (eritrocito, hígado y pulmón) (Kwong et al., 1993). De esta serie de estudios se puede extrapolar que, a grandes rasgos, las mayores diferencias observadas en cuanto al peso molecular del transportador de nucleósidos presente en las diferentes especies y los diferentes tejidos, son debidas a los diferentes grados de glicosilación que sufren los mismos, y que existe un sustancial grado de conservación estructural entre las diferentes especies y tejidos. En cambio, si bien el peso molecular que presenta el transportador de azúcares es idéntico, el patrón de digestión por tripsina y por endoglicosidasa-F es totalmente diferente, lo cual revela que ambos transportadores son proteínas diferentes aunque estructuralmente muy relacionadas. Las analogías estructurales entre ambos tipos de transportadores son lógicas, puesto que los dos median un proceso funcionalmente idéntico: la difusión facilitada de sustancias hidrofílicas a través de la membrana. Se puede suponer que el transportador nucleosídico tiene una estructura y organización en la membrana similar a la del transportador de glucosa. Este último transportador ha sido clonado en una línea celular de hepatoma humano (Mueckler et al., 1985) y en cerebro de rata (Birnbaum et al., 1986). En función de la secuencia aminoacídica y de los perfiles de hidrofobicidad se ha propuesto una disposición de doce dominios transmembrana que también puede ser considerada para el transportador de nucleósidos equilibrativo (Figura 3).

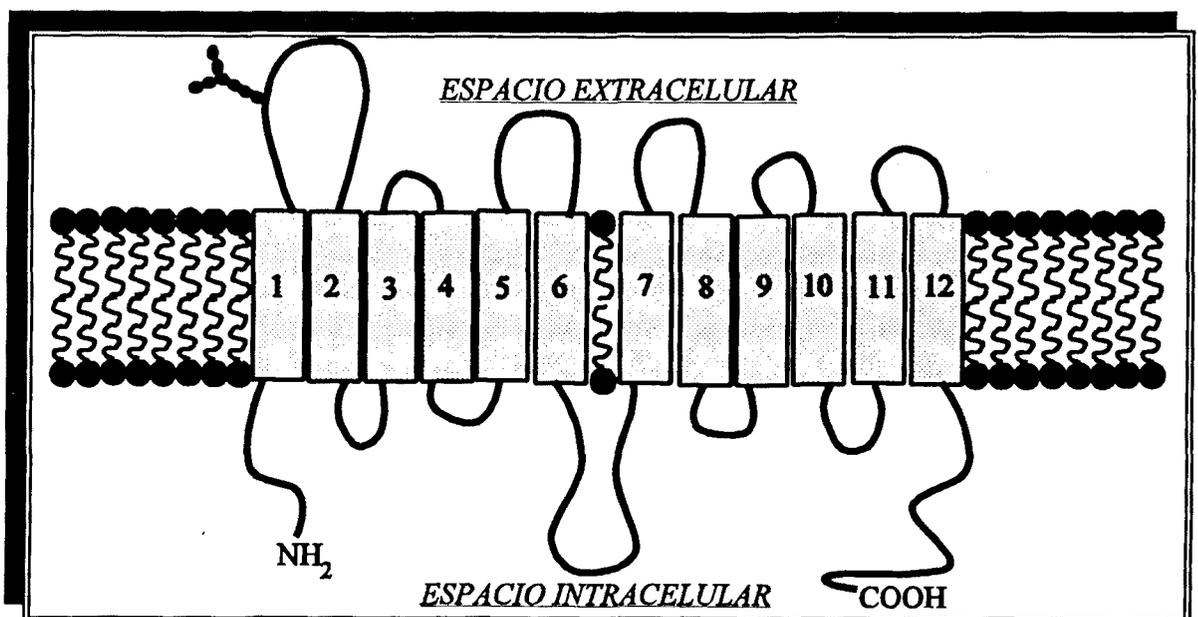


Figura 3. Modelo hipotético para la configuración estructural del transportador de nucleósidos equilibrativo.

#### A.2.2.4. Regulación del transportador nucleosídico equilibrativo.

La regulación del transporte nucleosídico depende de la regulación de la proteína que ejerce dicha función: el transportador nucleosídico equilibrativo. En la actualidad se posee muy poca información entorno a los factores que implican directamente una regulación del transportador de nucleósidos. Si lo comparamos con el transportador de azúcares, del cual se tiene más información (Baldwin, 1993; Gould and Holman, 1993), podríamos suponer que la regulación del transportador comprende dos procesos separados en función de su tiempo de acción. En primer lugar, se encontrarían los procesos de regulación fina o a corto plazo ( $t_{1/2} < 5$  h) los cuales implican esencialmente procesos de fosforilación y desfosforilación del transportador, y como resultado se obtendría una disminución de la capacidad máxima de transporte ( $V_{max}$ ) más que una variación de la afinidad ( $K_m$ ). Estos procesos no se ven afectados por inhibidores de la síntesis proteica y tampoco están asociados a cambios en los niveles de RNAm, por lo tanto, la desaparición de transportadores en la membrana celular podría ser explicada por un proceso de translocación de los mismos desde la membrana plasmática hasta el interior celular, inducido por un proceso de fosforilación previo.

La regulación del transportador equilibrativo por procesos de fosforilación-desfosforilación ha sido descrita para células cromafines (Sen et al., 1990; Delicado et al., 1991; Miras-Portugal et al., 1991) y para células S49 (Nagy et al., 1991). En este último caso, se ha relacionado el estado de fosforilación del transportador de nucleósidos con la sensibilidad del transportador a la inhibición del transporte por etanol. Se ha observado que en células S49 mutantes que carecen tanto de la proteína quinasa dependiente de AMPc como de los receptores que implicarían incrementos en los niveles de AMPc tras su posterior activación, el etanol no es capaz de inhibir el transporte de nucleósidos. Por otro lado, existen evidencias acerca de una posible interacción entre determinados receptores activadores de la adenilato ciclase y cuya activación implica la movilización de AMPc y el propio transportador de nucleósidos. Entre estos receptores se encontrarían los receptores de adenosina (Delicado et al., 1990).

En las células cromafines se ha observado que la presencia de activadores de la adenilato ciclase, tales como la forskolina, o activadores directos de la proteína quinasa A (Figura 4), tales como el análogo del AMPc, clorofenil-AMPc (Sen et al., 1990), provocan inhibición del transporte de nucleósidos, así como una disminución del número de centros de unión específica para el NBTI. Parece que en estas células la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc es la responsable de la inhibición observada, ya sea por fosforilación directa del transportador, o por fenómenos provocados por la fosforilación de otras proteínas. Por otro lado, esta misma proteína parece ser la responsable de la modulación de los fenómenos de exocitosis (Burgoyne, 1984; Higging and Berg, 1988) (Figura 4). A este respecto, las acciones mejor conocidas son las debidas a la proteína quinasa dependiente de ion calcio/calmodulina y proteína quinasa C. Ambas proteínas quinasa son activadas por la acción de secretagogos que implican efectos sobre la dinámica del citoesqueleto celular (Hikita et al., 1984; Bader et al., 1985) que conllevan la inhibición sobre el transporte de nucleósidos, al parecer por inhibición de los procesos de secreción celular. Recientemente, se ha descrito que la mayoría de células poseen un "pool" intracelular de transportadores que oscilan entre el 20 y el 50% del número total (Liang and Johnstone, 1992) los cuales serían susceptibles de ser regulados por los procesos descritos anteriormente.

Por otro lado, se ha descrito que la presencia de ATP o sus análogos no metabolizables provocan un aumento del número de centros de unión de NBTI sin modificar su actividad (Casillas et al., 1993). Este hecho sugiere un papel modulador del ATP en el transporte de

nucleósidos, no por procesos de hidrólisis del ATP, sino por su acción directa sobre un centro de unión de nucleótidos en el transportador de nucleósidos. Todos estos resultados son similares a los descritos para el transportador equilibrativo de glucosa, para el que se ha descrito su sensibilidad a la proteína quinasa A y C (Witters et al., 1985; James et al., 1989), así como un centro de unión de ATP (Hebert and Carruthers, 1986; Carruthers, 1990).

En segundo lugar, también se han descrito para el transportador de nucleósidos efectos de regulación crónica o a largo plazo ( $t_{1/2} < 12$  h), los cuales implicarían variaciones de una u otra manera en los niveles de transportador y del RNAm que codifica para el mismo. El factor de crecimiento neuronal (NGF) y la hormona tiroidea T3 ejercen un papel regulador del transporte nucleosídico a largo plazo en células cromafines (Torres et al., 1987; Fideu and Miras-Portugal, 1992). La hormona T3 induce la síntesis proteica, incrementando el número de transportadores en la membrana sin modificar su afinidad por la adenosina. Efectos similares de la misma hormona se han descrito para el transportador equilibrativo de glucosa en astrocitos (Roeder et al., 1988). Contrariamente, las hormonas glucocorticoides, esteroides sexuales y el ácido retinoico tienen un efecto inhibitorio a largo plazo sobre el transportador nucleosídico en timocitos de rata (Gagne et al., 1980) y en células cromafines bovinas (Fideu and Miras-Portugal, 1993).

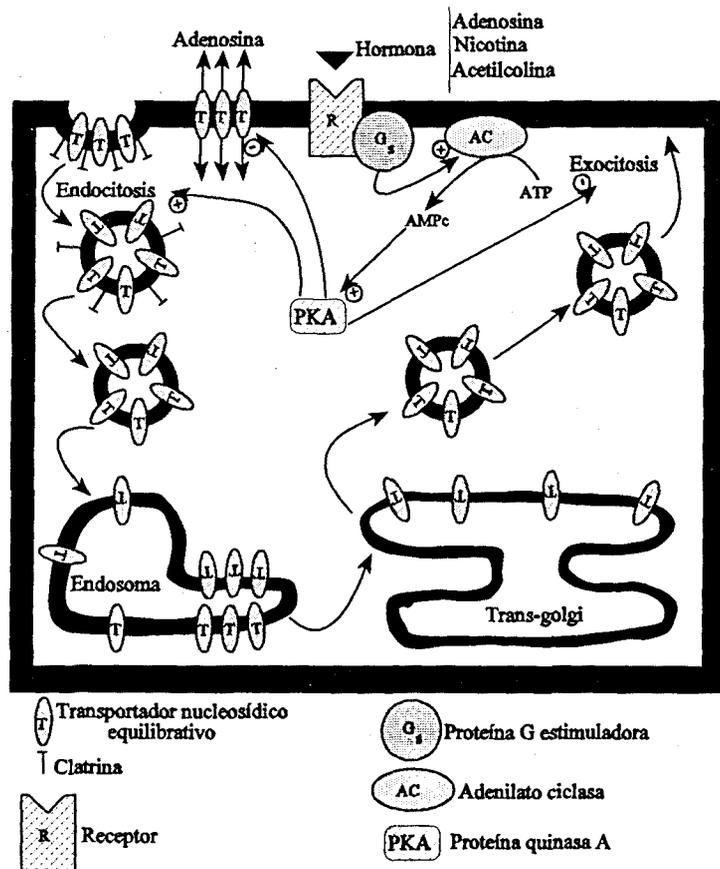


Figura 4. Modelo de regulación del transportador nucleosídico equilibrativo.

A pesar de todo este conjunto de datos acerca de la regulación del transportador de nucleósidos equilibrativo, tanto a corto como a largo plazo, los mecanismos bioquímicos y moleculares precisos de esta regulación están aún por desvelar.

### A.2.3. El transporte nucleosídico activo o concentrativo.

El transporte activo es un proceso unidireccional y concentrativo. Es también saturable por el sustrato y además implica un gasto energético para la célula. Al igual que el transporte pasivo, este proceso requiere una proteína transportadora específica. Los sistemas de transporte concentrativo para nucleósidos son "activos" en el sentido que transportan los nucleósidos contra gradiente de potencial electroquímico. Estos sistemas de transporte son absolutamente dependientes de  $\text{Na}^+$ , el cual es cotransportado al interior celular conjuntamente con el nucleósido en cuestión, de manera que es el gradiente de  $\text{Na}^+$  que poseen todas las células el que proporciona la energía necesaria para la entrada del nucleósido contra gradiente. De esta manera, este sistema de transporte es absolutamente dependiente de  $\text{Na}^+$ , con lo cual la eliminación de este ion del medio de incubación suprime totalmente el transporte activo de nucleósidos. Por otro lado y como característica general, todos los sistemas de transporte concentrativos de nucleósidos son resistentes a los inhibidores descritos para el transportador equilibrativo (NBTI, dipiridamol, dilazep, etc...).

La especificidad de los transportadores concentrativos para diferentes nucleósidos ha permitido diferenciar tres tipos de transporte activo: un primer grupo que presenta una mayor selectividad por nucleósidos de purinas (denominado *cif* o N1) (Belt et al., 1992), un segundo grupo el cual es más selectivo para los nucleósidos de pirimidinas (denominados *cit* o N2) (Crawford and Belt, 1991), y un tercer grupo, que presenta un amplio intervalo de transporte tanto de nucleósidos de purinas como de pirimidinas (denominados *cib* o N3) (Huang et al., 1993). En general, la afinidad de estos transportadores para los diferentes sustratos es mucho mayor que la que presentan los transportadores equilibrativos. Concretamente en el caso del transportador *cif* la  $K_m$  para la adenosina tiene un valor de 1-10  $\mu\text{M}$ .

Se ha observado la presencia de transportador de nucleósidos  $\text{Na}^+$ -dependiente en diferentes tipos celulares y tejidos, como es el caso del tejido epitelial de yeyuno (Roden et al., 1988), enterocitos intestinales aislados (Vijayalakshmi and Belt, 1988), epitelio del plexo coroide (Spector and Huntoon, 1984), hepatocitos (Ungemach and Hegner, 1978), esplenocitos (Plagemann and Woffendin, 1989), macrófagos (Plagemann and Aran, 1990) y en vesículas membranosas procedentes de epitelio intestinal y renal (Franco et al., 1990 b; Williams and Jarvis, 1991). Distintos tipos celulares como IEC-6 de epitelio intestinal de rata, L1210 que son células leucémicas de ratón y HL-60 que son células leucémicas humanas, también presentan una actividad transportadora de nucleósidos  $\text{Na}^+$ -dependiente (Jakobs and Paterson, 1986; Dagnino et al., 1991; Belt et al., 1992).

Empleando técnicas de biología molecular, en 1992 Pajor and Wright consiguieron clonar un transportador concentrativo de nucleósidos denominado SNST1 empleando una biblioteca de cDNA de riñón de conejo y utilizando como sonda un fragmento del cotransportador  $\text{Na}^+$ -glucosa (SGLT1). La expresión del transportador SNST1 en oocitos de *Xenopus* da lugar a la estimulación del transporte de uridina. Los 672 aminoácidos codificados por SNST1 tienen un 61% de identidad y un 80% de similitud con la secuencia de SGLT1. La predicción de la estructura secundaria de este transportador muestra la existencia de doce dominios transmembrana. Las homologías entre estos dos transportadores y otros transportadores bacterianos sugiere la existencia de una familia de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  ampliamente distribuidos por todo el organismo. La ausencia de expresión de SNST1 en la mucosa intestinal de conejo parece indicar que el cotransporte  $\text{Na}^+$ /nucleósido descrito en este tejido (Jarvis, 1989) es debido a una proteína diferente de la identificada en riñón.

Recientemente, Huang et al., (1994) empleando una biblioteca de cDNA de tejido epitelial

de yeyuno de rata han conseguido aislar un cDNA que codifica para un transportador de nucleósidos Na<sup>+</sup>-dependiente (denominado cNT1). De la secuencia de cDNA clonada se puede deducir que codifica para una proteína de 648 aminoácidos y de un peso molecular relativo de 71 kDa, la cual poseería 14 dominios que potencialmente podrían ser de transmembrana. No hay ninguna similitud de secuencia entre cNT1 y cualquier otra proteína presente en mamíferos. Por otro lado, los análisis de homología de secuencia indican una similitud de secuencia significativa con la proteína NUPC, que es una proteína de transporte simporte protón/nucleósido presente en *Escherichia coli*. Funcionalmente, la proteína transportadora cNT1 presenta las características de transporte tipo *cit* (selectivo para los nucleósidos de pirimidinas y adenosina), siendo permeable al 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT) ( $K_m = 0.49$  mM). Esta es la primera evidencia que el AZT penetra en la célula a través de un proceso mediado por un transportador, al mismo tiempo que también se ha descrito su entrada por un proceso de difusión simple. De manera acorde con la distribución tisular del sistema de transporte tipo *cit*, se ha detectado la expresión de cNT1 en riñón al igual que en yeyuno (Huang et al., 1994).

### A.3 LA ACCIÓN CATABÓLICA DE LA ADENOSINA DESAMINASA.

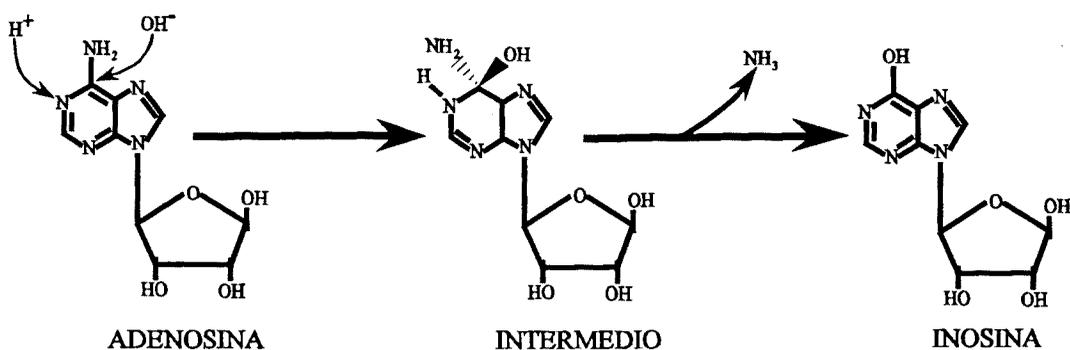
Tal y como se ha descrito anteriormente, la mayoría de células poseen sistemas de transporte específicos para nucleósidos que pueden intervenir tanto en la aparición (transporte desde el citoplasma al medio extracelular), como en la eliminación (incorporación en las células) de adenosina del medio extracelular. Por otro lado, la gran mayoría de células poseen las ectoenzimas necesarias para producir adenosina extracelular a partir de nucleótidos purínicos. Bajo esta perspectiva, cabe destacar que recientemente se ha puesto de manifiesto la existencia de ectoadenosina desaminasa en algunas células (Franco et al., 1990 b; Aran et al., 1991). Dado que no se ha detectado actividad adenosina quinasa extracelular, la ecto-ALA se convierte en la única enzima capaz de catabolizar adenosina en este compartimento.

#### A.3.1. Caracterización cinética de la adenosina desaminasa.

La adenosina desaminasa, ALA, (EC.3.5.4.4) es una enzima del metabolismo purínico que cataliza la desaminación irreversible de los nucleósidos adenosina y 2'-desoxiadenosina, rindiendo inosina y 2'-desoxiinosina respectivamente.

La adenosina desaminasa es una enzima de comportamiento cinético michaeliano, con una  $K_m$  para la adenosina de 10-100  $\mu$ M según el organismo (Van Der Weyden and Kelley, 1976; Fonoll et al., 1982; Martínez et al., 1984; Lupidi et al., 1992). El mecanismo catalítico se inicia con el ataque de una molécula de agua sobre la adenosina y la consiguiente formación de un intermediario tetrahédrico, seguida por la liberación de amoníaco e inosina (Figura 5) (Kurz and Frieden, 1983; Kurtz et al., 1985; Wolfenden and Frick, 1986; Frick et al., 1986). La etapa limitante en la desaminación de la adenosina es la protonación del intermedio tetrahédrico (Orozco et al., 1989; 1990 a, b, c).

Recientemente (Wilson et al., 1991) se ha conseguido resolver la estructura cristalina de la ALA unida al 6-hidroxil-1,6-dihidropurina ribonucleósido, un inhibidor cuya estructura química es similar a la del intermediario tetrahédrico. Estos resultados no sólo han permitido determinar la situación exacta del centro activo de la enzima y de los residuos aminoacídicos que intervienen en la reacción, sino que han demostrado que un átomo de Zn<sup>2+</sup> interviene como cofactor de la reacción.

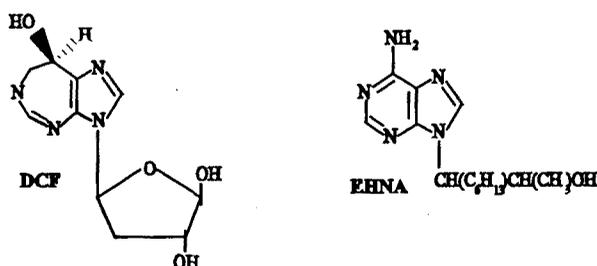


**Figura 5.** Reacción de desaminación catalizada por la adenosina desaminasa.

En función del mecanismo descrito para la reacción de desaminación catalizada por la ALA, existen básicamente dos clases de inhibidores de la actividad de esta enzima:

- Inhibidores análogos de la adenosina, tales como la inosina y la nebularina, de tipo competitivo y con  $K_i$  similares a los valores de  $K_m$  de la adenosina para la enzima. Una excepción es el inhibidor 9-(eritro-2-hidroxi-3 nonil)adenina (EHNA) (Figura 6) el cual muestra una  $K_i$  del orden de nanomolar (Schaeffer and Schwender, 1974).

- Inhibidores análogos del estado de transición, tales como la coformicina (Nakamura et al., 1974) y su análogo la 2'-desoxicoformicina (DCF) (Figura 6) (Woo et al., 1974). Estos son los inhibidores de la adenosina desaminasa más potentes que existen, siendo de carácter irreversible. En el caso de la 2'-desoxicoformicina, se ha comprobado que la unión de una molécula de inhibidor a la enzima da lugar a la formación de un complejo reversible, con una constante de disociación de 100  $\mu$ M, pero que un cambio conformacional posterior provoca la unión irreversible del inhibidor a la enzima. Los valores de  $K_i$  descritos para la 2'-desoxicoformicina son inferiores a nanomolar (Agarwal et al., 1977; Showalter et al., 1983; Kurz et al., 1987).



**Figura 6.** Inhibidores de la adenosina desaminasa.

### A.3.2. Caracterización molecular de la adenosina desaminasa y de su proteína de unión.

Los estudios realizados a principios de la década de los setenta indicaban la existencia de diferentes formas de esta enzima; así, en órganos como el estómago, timo, bazo y nódulos linfáticos aparecía una forma de ADA de bajo peso molecular (40 kDa), mientras que en riñón, pulmón, hígado y páncreas la forma presente posee un elevado peso molecular (200 kDa) (Spencer et al., 1968; Carson et al., 1987). A su vez, al analizar hemolisados la forma de bajo

peso molecular mostraba diferentes patrones electroforéticos (Spencer et al., 1968), que se atribuyeron a la existencia de diferentes alelos del único gen que codifica para esta enzima, localizado en el cromosoma 20 (Creagen et al., 1974; Tischfield et al., 1974). La clonación y posterior secuenciación del gen de la ADA humana (Daddona et al., 1984; Yeung et al. 1985; Wiginton et al., 1986) demostró que esta enzima está formada por 362 aminoácidos con un peso molecular de 40638 Da. La secuencia de aminoácidos de la ADA de E.coli está formada por 332 aminoácidos, con un peso molecular de 36345 Da (Chang et al., 1991). La secuencia aminoacídica de la ADA de E.coli muestra una similitud del 50 % y una homología del 33 % con la de ratón y humana. Aunque hay una gran cantidad de aminoácidos conservados entre la ADA de E.coli y la de mamíferos, hay únicamente cuatro secuencias de cuatro o más residuos de aminoácidos contiguos completamente conservados (Chang et al., 1991). La existencia de la forma de ADA de elevado peso molecular quedó explicada con el descubrimiento de una proteína capaz de unirse a la forma de ADA de bajo peso molecular (Hirschhorn, 1975; Van der Weyden and Kelley, 1976), denominada proteína de unión de ADA (*ADA Binding Protein*, ADAbp). Esta proteína, cuya funcionalidad se desconocía en el momento de su descubrimiento, es un dímero, y cada subunidad tiene un peso molecular de 106 kDa (Daddona and Kelley, 1978).

La adenosina desaminasa se consideró durante mucho tiempo una enzima citosólica. Sin embargo, numerosos estudios tanto bioquímicos (Agarwal and Parks, 1975; Van der Weyden and Kelley, 1976; Tritsch et al., 1985; Franco et al., 1986a, b; 1988; Meghji et al., 1988), como de tipo inmunocitoquímico (Andy and Kornfeld, 1982; Nagy et al., 1984; Schrader and West, 1985; Meghji et al., 1988; Shrader et al., 1988; 1994; Franco et al., 1990b; Aran et al., 1991; Martín et al., 1993) han demostrado la existencia de una forma de esta enzima ligada a la membrana citoplasmática (ecto-ADA). Diferentes estudios han descartado la existencia de posibles dominios transmembranales de la ecto-ADA, lo cual indica que esta forma de ecto-ADA se halla asociada a la membrana, pero no es una proteína integral de la misma. Posteriormente se ha establecido que esta ecto-enzima corresponde a la forma de ADA de elevado peso molecular, constituida por la unión de la enzima a la proteína ADAbp. Recientemente, se ha demostrado que la ADAbp tiene actividad proteásica, la cual se corresponde con la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) (EC 3.4.14.5). Más tarde se dedujo que era la misma proteína que el CD26, un antígeno de diferenciación de linfocitos T (Kameoka et al., 1993; Morrison et al., 1993; De Meester et al., 1994).

La ADAbp /DPP IV /CD26 es un dímero altamente glicosilado con dos subunidades de peso molecular 106 kDa cada una. Cada subunidad se halla anclada a la membrana a través de un dominio transmembranal situado muy cerca del extremo N-terminal. Recientemente la clonación de cDNAs que codifican para la proteína ADAbp/DPP IV/CD26 en rata, ratón y humano ha demostrado una elevadísima conservación entre diferentes especies de mamíferos, con una homología del 98% (Ogata et al., 1989; Marguet et al., 1992; Darmoul et al., 1992; Tanaka et al., 1992; Yaron and Naider, 1993). La secuencia aminoacídica para la proteína humana es de 776 aa con un peso molecular de 88.3 kDa. La predicción de la estructura de la proteína a partir de la secuencia aminoacídica muestra un dominio intracelular de 6 aa, un dominio transmembranal de 22 aa y un dominio extracelular de 738 aa, el cual contiene el centro activo y el centro de unión de la ADA (Yaron and Naider, 1993). La capacidad de interacción directa entre el CD26 y la ADA en linfocitos T se ha puesto de manifiesto por técnicas de co-inmunoprecipitación con anticuerpos específicos (Kameoka et al., 1993; Morrison et al., 1993), así como por técnicas de citometría de flujo (De Meester et al., 1994). La actividad dipeptidil peptidasa del CD26 no es necesaria para la interacción con la ADA, puesto que las moléculas de CD26 que han perdido su capacidad catalítica no pierden la capacidad de unir ADA (Kameoka et al., 1993).

### *A.3.3. Distribución y función biológica de la Adenosina Desaminasa.*

La enzima adenosina desaminasa está presente en todos los tejidos de mamíferos. En el sistema nervioso central y periférico esta enzima adquiere una gran importancia debido a que la adenosina en este tejido actúa como un importante neuromodulador en la sinapsis nerviosa (Williams, 1990). La distribución de la ADA en el sistema nervioso es heterogénea. Su localización tisular se ha estudiado básicamente por medidas de su actividad enzimática, aunque recientemente se ha ensayado con éxito la unión de desoxicoformicina tritiada, un potente inhibidor de la ADA, para su cuantificación (Padua et al., 1992). En el cerebro, las regiones con mayor actividad ADA son: plexus coroideo, hipotálamo posterior, bulbo olfatorio, colliculus superior y teleencéfalo, siendo las subregiones del hipocampo y cuerpo calloso las de menor actividad. En tejidos periféricos como ganglios, nervios, pulmón, timo y epitelio papilar, la actividad es mucho mayor que en cerebro (Geiger and Nagy, 1986).

Sin embargo, donde parece tener un papel más relevante es en tejidos de origen linfoide. En las células del sistema linfoide desempeña un papel primordial en la diferenciación y maduración de las mismas, y su importancia se pone de manifiesto al analizar las disfunciones metabólicas que se producen tanto en ausencia de la enzima, como en procesos patológicos en que el ADA se halla en exceso. Así, la deficiencia hereditaria de ADA causa inmunodeficiencia severa combinada (SCID), caracterizada por la disminución del número de linfocitos T y B (Wilson et al., 1991; Parkman and Gelfand, 1991). Esta enfermedad podría ser debida al efecto citotóxico de los sustratos de la ADA, adenosina y 2'-desoxiadenosina, acumulados en los linfocitos (Giblett et al., 1972; Hirschhorn et al., 1973; Meuwissen et al., 1975; Kellems et al., 1985; Valerio et al., 1986; Franco, 1991; Hirschhorn, 1992). Por el contrario, aumentos de la actividad ADA han sido relacionados con anemias hemolíticas y leucemias linfoblásticas (Paglia et al., 1970; Valentine et al., 1977; Chottiner et al., 1987).

Las variaciones de los niveles de ADA se han asociado a numerosos estados patológicos: enfermedad de Hodgkin, leucemia aguda, SIDA, anemia hipoplásica congénita, síndrome de Down, disfunción hepática, fiebre tifoidea, sarcoidosis y diversos tumores malignos (Formeister and Tristch, 1976; Puukka et al., 1981; Taylor, 1984; Morisaki et al., 1985, 1988; Murray et al., 1985; Vezzoni et al., 1985; Maeda et al., 1990; Margalith and Hendler, 1991; Bañales et al., 1991; Niedzwicki et al., 1991; Christensen et al., 1991). Recientemente, Hovanessian y colaboradores del Instituto Pasteur de París han observado que el virus del SIDA debe interactuar con el CD26 para que se produzca la infección. La coexpresión de CD4 y CD26 en fibroblastos permite que estas células sean infectadas por el virus HIV, mientras que la transfección únicamente de CD4 no permite la infección. Estos resultados indican que el CD26 actuaría como co-receptor del virus del SIDA junto con el CD4 (Callebaut et al., 1993). Este hecho, contradicho por otros investigadores que describen la infección de células CD4<sup>+</sup> y CD26<sup>-</sup> por el virus HIV (Balter, 1993; Morimoto et al., 1994), podría ser clave en el papel fisiológico que desempeña la ADA en la infección del virus del SIDA.

Sin duda, una función de la ADA en el mecanismo celular sería la del control de la concentración de la adenosina. La ecto-ADA, junto con los transportadores nucleosídicos, regulan los niveles extracelulares de la adenosina y en última instancia los efectos fisiológicos de la adenosina mediados por los receptores específicos (Schrader et al., 1994). El conjunto de estos fenómenos ha conducido al estudio del papel farmacológico de la adenosina en síndromes de inmunodeficiencia (Franco, 1991) y ha creado un gran interés en la búsqueda de análogos de la adenosina (DCF, EHNA,...) que actúen como activadores o inhibidores de la ADA, para así modificar la acción de la adenosina endógena tanto en condiciones fisiológicas como patológicas

(Dillman, 1994).

#### A.4. LOS RECEPTORES PURINÉRGICOS.

Los nucleósidos y nucleótidos de adenina ejercen una gran variedad de efectos en numerosos tipos de células. Estas acciones resultan de la activación de receptores discretos de membrana a los cuales, generalmente, se les conoce como purinoreceptores. Basándose en un análisis extensivo de la literatura existente, en 1978 Burnstock sugirió que había dos clases de purinoreceptores que denominó receptores purinérgicos  $P_1$  y  $P_2$ . Esta clasificación estaba basada en cuatro criterios primordiales: (a) comparación farmacológica de las potencias relativas de ATP, ADP, AMP y adenosina; (b) observaciones de las acciones selectivas de los antagonistas, en concreto de las metilxantinas; (c) modulación de la adenilato ciclasa por adenosina y no por ATP; y (d) inducción de la síntesis de prostaglandinas por ATP y no por adenosina. Los purinoreceptores  $P_1$  (receptores de adenosina) son más sensibles a la adenosina y AMP que al ADP y ATP, siendo la acción del ligando antagonizada por las metilxantinas tales como la teofilina y la cafeína. La estimulación de los purinoreceptores  $P_1$  induce una modulación de la actividad de la adenilato ciclasa. Por otro lado, los purinoreceptores  $P_2$  (receptores de ATP) son más sensibles al ATP y ADP que al AMP y adenosina, no son antagonizables por metilxantinas, y su activación no implica una modulación de la actividad adenilato ciclasa. Su estimulación se asoció con la síntesis de prostaglandinas (Burnstock, 1978; Burnstock and Buckley, 1985).

Desde que se estableció esta primera clasificación, se han propuesto distintas subdivisiones de los purinoreceptores tanto  $P_1$  como  $P_2$ , basándose en la producción de segundos mensajeros, en la caracterización bioquímica de las moléculas de receptor y en la biología molecular de los receptores para los nucleósidos y nucleótidos de adenina (Dalziel and Westfall, 1994).

##### A.4.1. Purinoreceptores $P_2$ o receptores de ATP.

A pesar de que el ATP y el resto de nucleótidos de adenina juegan un papel crucial en el metabolismo intracelular y son, básicamente, impermeables a la membrana plasmática, existen diferentes fuentes de suministro de ATP extracelular que permiten su interacción con los receptores específicos de la superficie de la célula.

En el sistema nervioso autónomo el ATP es liberado como un cotransmisor por las neuronas simpáticas y parasimpáticas. El ATP también puede ser liberado por preparaciones sinaptosomales de corteza cerebral, hipotálamo y médula. En los sinaptosomas corticales parte del ATP es liberado juntamente con acetilcolina o norepinefrina, pero la mayor parte proviene de neuronas que son no-adrenérgicas y no-colinérgicas. Cuando es coliberado, lo hace en una proporción mucho menor que la del principal neurotransmisor. Por ejemplo, en terminales nerviosas colinérgicas purificadas por afinidad, el ATP y la acetilcolina se liberan en una proporción 1:10. En estos casos el ATP se encuentra coalmacenado con el neurotransmisor principal y se libera por mecanismos típicos de fusión de membranas de vesículas sinápticas, lo que no implica un transporte a través de la membrana. En células no neuronales el ATP puede ser transportado a través de membranas de borde de cepillo o apicales de túbulo proximal de riñón por una proteína aún no clonada (Elgavish and Elgavish, 1985), o bien a través de transportadores del tipo ABC, *ATP-binding cassetes* (Abraham, 1994). Sea cual sea la forma de liberarse, el ATP es degradado rápidamente por las enzimas extracelulares (véase A.1.2.), lo que provoca la formación de adenosina.

La clasificación actual de los receptores para el ATP es aproximada, debido al conocimiento

limitado que se tiene acerca de la estructura de esta clase de receptores y por la falta de antagonistas selectivos para los mismos. La mejor clasificación que se ha conseguido de estos receptores se ha basado esencialmente en el orden de potencias relativo de agonistas capaces de desencadenar una respuesta funcional. Basándose en este tipo de estudios se ha sugerido la siguiente clasificación:  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2Z}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2U}$  y  $P_{2S}$  (Cussack, 1993). Los perfiles farmacológicos y su localización están resumidos en la tabla I. Los receptores  $P_{2X}$  son activados preferentemente por  $\alpha\beta$ MATP y al parecer se downregulan rápidamente en presencia de su agonista (Hourani et al., 1985). Este subtipo de receptor se encuentra en el tracto gastrointestinal, venas, arterias, tracto genitourinario, vejiga, vaso deferente, membrana nictitante, músculo cardíaco y en células PC12. El receptor activa un canal que aumenta rápidamente ( $<1$  ms) la entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula. Este tipo de canales se encuentran también en el sistema nervioso central, donde también está presente el subtipo  $P_{2X}$  (Edwards et al., 1992). El ligando 2-SATP activa los receptores  $P_{2Y}$  con bastante selectividad (Hourani et al., 1985); estos receptores han sido caracterizados en eritrocito, en hígado y en células endoteliales. Se encuentran acoplados a una proteína  $G_q$ , por la cual activan la proteína quinasa C y producen movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular por un mecanismo dependiente de  $IP_3$ . Los receptores  $P_{2Y}$  localizados en células endoteliales provocan la liberación del factor relajante dependiente de endotelio (EDRF) y vasodilatación. El efecto vasodilatador del subtipo  $P_{2Y}$  se contrarresta con el efecto vasoconstrictor provocado por el subtipo  $P_{2X}$  localizado en la vasculatura del músculo liso. Se cree que el  $ATP^{4-}$ , una forma minoritaria del ATP que se presenta libre de cationes divalentes, activa mastocitos y macrófagos a través de un receptor purinérgico  $P_{2Z}$  (Steinberg and Silverstein, 1987). Los receptores  $P_{2Z}$  se encuentran en diferentes células sanguíneas y parecen estar implicados en las respuestas inflamatorias (Osipchuk et al., 1992). Por otro lado, el ADP activa plaquetas a través de receptores purinérgicos tipo  $P_{2T}$  (Haslam and Cussack, 1981). Estos receptores se han encontrado exclusivamente en plaquetas, en sus precursores (megacariocitos) y en determinadas líneas celulares en cultivo. Su característica principal es que el ADP es el agonista natural más potente y el ATP es un antagonista competitivo. La unión de ADP provoca, a través de una proteína G, una inhibición de la acumulación de AMPc, una movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular y una estimulación de la secreción granular. La respuesta de las plaquetas al ADP se inhibe por la activación de la proteína quinasa C mediante ésteres de forbol (Linden, 1994). El receptor  $P_{2U}$ , también llamado receptor de pirimidina, se caracteriza por el hecho de que es activado por igual tanto por el UTP como por el ATP (O'Connor et al., 1991; Linden, 1994). Por último, el receptor purinérgico  $P_{2S}$  media respuestas contráctiles al unir análogos del ATP y puede ser bloqueado por ácido sulfónico *p*-cloromercuriobenceno (el cual bloquea también los receptores  $P_{2X}$  de vaso deferente), pero no por RB2 (Wiklund and Gustafsson, 1988).

Recientemente, se ha clonado un receptor  $P_{2Y}$  (Webb et al., 1993) y un  $P_{2U}$  (Lustig et al., 1993). Estos dos receptores muestran entre sí una homología de secuencia bastante baja y, sorprendentemente, el mayor grado de homología de secuencia lo presentan con los receptores de trombina, angiotensina II y del factor activación plaquetaria. Por otra parte, muestran sólo un 20 % de homología de secuencia con los receptores de adenosina, indicando que pueden constituir una nueva clase de receptores acoplados a proteína G.

#### *A.4.2. Purinoreceptores $P_3$ o receptores de ATP y adenosina.*

En muchos estudios se ha demostrado la capacidad de la adenosina para modular la liberación de norepinefrina de los nervios postgangliónicos simpáticos. Este fenómeno ha sido observado en gran variedad de tejidos, incluyendo los vasos deferentes, glándulas salivares,

**TABLA II. Características de los purinoreceptores.**

Purinoreceptores P <sub>1</sub> .		Purinoreceptores P <sub>2</sub> .		Purinoreceptores P <sub>3</sub> .		
Nomenclatura.	A <sub>1</sub> .	A <sub>2</sub> .	A <sub>3</sub> .	A <sub>4</sub> .		
Agonista.	Alta afinidad	Baja afinidad	CGS21680=NECA	NECA>CGS21680	ABA=APNEA	CV1808
Antagonistas.	CPA≥R-PIA>NECA>S-PIA>CV1808	NECA>CV1808>R-PIA≥S-PIA			ABA>NECA=PIA	
Mecanismo de Transducción.	DPCPX, 8-CPT, 8-SPT	KF17837, CP66713	Ninguno		ABOPX, DPCPX	CGS15943A
Gen.	Acoplado a Proteína G <sub>i(1-3)</sub> , IAMPc	Acoplado a Proteína G, IAMPc			Proteína G	Acoplado a canal de K
Localización/Función.	AI (RDCer7, canino)	A2A(RDC8, canino)	A2B(RFL9, rata)			Cerebro
	Cerebro, adipocitos.	Ileon	Estriado, corazón	Intestino, pulmón		Cerebro, pulmón
Purinoreceptores P <sub>2</sub> .		Purinoreceptores P <sub>2x</sub> .		Purinoreceptores P <sub>2y</sub> .		
Nomenclatura.	P <sub>2x</sub> .	P <sub>2y</sub> .	P <sub>2z</sub> .	P <sub>2r</sub> .	P <sub>2s</sub> .	
Agonista.	αβMATP>ATP=2-SATP	2-SATP>ATP>αβMATP	ATP	ADP	UTP>ATP>ADP>AMP	2-SATP>ATP=ADP
Antagonistas.	ANAPP <sub>3</sub> , suramina.	RB2, suramina.	2-SATP	ATP	Ninguno	pCMBS
Mecanismo de Transducción.	Acoplado a canal catiónico.	Acoplado a Proteína G	Poros no selectivos	Acoplado a Proteína G	Acoplado a Proteína G	
Gen.		IP3/Ca/DAG	ICa	IP3/Ca/DAG/IAMPc	IP3/Ca/DAG	
Localización/Función.	Musculatura lisa/Contracción.	P2Y1(chick brain)	Mastocitos/Desgranulación	Plaquetas/activación	P2R (murine)	Ileon de cobaya
		Liberación de EDRF/Relajación	Desgranulación		Neutrófilos/Desgranulación	Contracción
Purinoreceptores P <sub>3</sub> .		P <sub>3</sub> (facilitativo).				
Nomenclatura.	P <sub>3</sub> (inhibitorio).	P <sub>3</sub> (facilitativo).				
Agonista.	2-CADO>αβ>ATP=ADO					
Antagonistas.	8-SPT, αβ-MATP					
Mecanismo de transducción.						
Gen.						
Localización/Función.	Nervios postganglionares simpáticos	Nervios postganglionares simpáticos vasculares/†Liberación neurotransmisores				
	vasculares y no vasculares/†Liberación neurotransmisor					

corazón y en varios tipos de vasos sanguíneos (Clanachan et al., 1977; Fredholm et al., 1982; Husted and Nedergaard, 1981). Este efecto de la adenosina ha sido atribuido a su acción sobre receptores purinérgicos  $P_1$  localizados a nivel prejunctional. Por otro lado, el ATP también ha demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la liberación de norepinefrina en diferentes tejidos (Paton, 1981; Su, 1983), un efecto que fue durante mucho tiempo atribuido a la acción de la adenosina, derivada de la degradación del ATP por ecto-ATPasas actuando a través de receptores purinérgicos  $P_1$ , más que a la acción directa del ATP sobre receptores  $P_2$ . Aunque muchos de estos efectos pueden ser atribuidos a la formación de la adenosina, actualmente existen evidencias que demuestran que los nucleótidos pueden actuar directamente sobre la inhibición de la liberación de neurotransmisor sin la generación de adenosina (Kügelgen et al., 1992; Fuder et al., 1992).

Se ha propuesto una tercera clase de receptores purinérgicos distinta de los  $P_1$  y de los  $P_2$ , y que está localizada en los nervios simpáticos del tallo arterial de rata (Shinozuka et al., 1988) y en vasos deferentes de rata (Forsyth et al., 1991). Este nuevo subtipo de purinoreceptor se ha denominado receptor  $P_3$  (Shinozuka et al., 1988) (tabla II). Las características diferenciales con respecto a los tipos  $P_1$  y  $P_2$  son las siguientes: (a) mientras que el purinoreceptor  $P_1$  se considera primariamente como un receptor nucleósido (adenosina) y el receptor  $P_2$  como nucleotídico (ATP), el receptor  $P_3$  es activado por ambos, nucleósidos y nucleótidos; (b) las alquilxantinas tales como la 8-SPT, la cual antagoniza las respuestas mediadas por receptores  $P_1$ , pero no las de los receptores  $P_2$ , también antagoniza las respuestas mediadas por los receptores  $P_3$ ; este efecto es aparentemente independiente de la formación de adenosina a partir de ATP; (c)  $\alpha,\beta$ -metilenATP, el cual es un potente agonista y agente desensibilizante en los receptores  $P_2$  pero no en los  $P_1$ , parece ser un antagonista de los receptores  $P_3$ . El conjunto de resultados parece indicar que ambos, nucleósidos y nucleótidos, podrían inhibir la liberación de neurotransmisor por acción separada sobre receptores  $P_1$  y  $P_2$  respectivamente, o por acción sobre un receptor "híbrido"  $P_3$  que poseería algunas características de los receptores  $P_1$  y de los  $P_2$ .

#### *A.4.3. Purinoreceptores $P_1$ o receptores de adenosina.*

##### *A.4.3.1. Clasificación de los receptores de adenosina.*

Tras el descubrimiento del AMPc como segundo mensajero y de las enzimas asociadas a su formación (adenilato ciclasa) y destrucción (AMPc fosfodiesterasa), se dirigió un considerable esfuerzo hacia la evaluación de inhibidores de la fosfodiesterasa. Estos fármacos inhiben la hidrólisis del AMPc y por lo tanto, potencian el efecto de activación de la adenilato ciclasa. Estudiando estos fármacos, se encontró que una clase de inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa, las denominadas xantinas como la teofilina y la cafeína, paradójicamente inhibían la generación de AMPc en cerebro de cobaya por acción de la adenosina, mientras que el resultado esperado era un aumento del AMPc (Sattin and Rall, 1970). A raíz de esto, se sugirió que la modulación de la respuesta inhibitoria de estas xantinas sobre la adenilato ciclasa, era debida a su acción como antagonistas de la adenosina. Por otro lado, se demostró que la adenosina causaba un efecto dual, que era dependiente de la concentración, sobre la activación de la adenilato ciclasa, produciendo un aumento en el contenido de AMPc del tejido a bajas concentraciones y una disminución a altas concentraciones (Sattin and Rall, 1970). Estas observaciones estuvieron apoyadas por el descubrimiento de centros discretos de reconocimiento para la adenosina, en los que la unión del nucleósido induce modulación positiva o negativa de la adenilato ciclasa (Londos and Wolf, 1977; Van Calker et al., 1979; Londos et al., 1980, 1983).

De esta manera, los receptores para la adenosina se podían subclasificar empleando concentraciones apropiadas de adenosina para modular la actividad de la adenilato ciclasa. Estos subtipos de receptores de adenosina se denominaron  $A_1$  y  $A_2$ , pudiendo inhibir ( $A_1$ ) o activar ( $A_2$ ) la adenilato ciclasa (Van Calker et al., 1979). Independientemente, Londos et al., 1980 también realizaron una subdivisión de los receptores de adenosina en función de su modulación sobre la adenilato ciclasa. En esta clasificación se denominan como  $R_i$  y  $R_a$  (correspondiendo al  $A_1$  y al  $A_2$  respectivamente), debido al requerimiento de una base de ribosa intacta (denominada R) y a su influencia inhibitoria (vía receptores  $R_i$ ) o activadora (vía receptores  $R_a$ ) sobre la adenilato ciclasa. Puesto que pronto se comprobó que no era la adenilato ciclasa el único sistema efector que se podía encontrar asociado a los receptores de adenosina, la nomenclatura recomendada fue la propuesta por Van Calker, que es la de uso más extendido, y en base a la cual se han clasificado los nuevos receptores identificados.

En algunos casos, los cambios en los niveles de AMPc no son correlativos con los efectos modulados por la adenosina, probablemente debido a que la adenosina modifica a otros sistemas de segundos mensajeros (Morgan, 1991). Por este motivo, la actual subclasificación de los purinoreceptores  $P_1$  en las subclases  $A_1$  ( $R_i$ ) y  $A_2$  ( $R_a$ ) está basada principalmente en la potencia relativa de agonistas de análogos de adenosina para generar segundos mensajeros. Los principales análogos empleados en estos estudios son R-PIA, S-PIA, CHA, NECA, CADO y adenosina. El perfil del orden de potencia para la unión de estos análogos de adenosina a los distintos subtipos de receptores de adenosina se muestra en la tabla II. Los receptores  $A_1$  presentan más afinidad por el isómero R de la PIA, mientras que el subtipo  $A_2$  no presenta esta estereoselectividad (Paton and Kurahashi, 1981); la NECA es un agonista no selectivo para ambos subtipos.

La disponibilidad inicial de ligandos para el subtipo  $A_1$ , permitió avanzar en su estudio, siendo, por otro lado, el subtipo de receptor mejor conocido. Su capacidad para asociarse a diferentes tipos de respuestas fisiológicas puede hacer pensar en la existencia de diferentes subclases dentro de este subtipo  $A_1$ . No obstante, estas diferencias son probablemente debidas a su capacidad de interacción con diferentes proteínas G responsables de cada una de las respuestas fisiológicas observadas (Linden, 1994). Por otro lado, en base a las afinidades presentadas para los diferentes agonistas y antagonistas característicos de los receptores  $A_1$ , se propuso una subclasificación de este subtipo  $A_1$  (Gustafsson et al., 1990). En efecto, los receptores  $A_1$  presentes en cerebro de rata presentan mayor afinidad por los agonistas y antagonistas que los receptores presentes en vasos deferentes e ileón del mismo animal. En base a estas observaciones, se propuso que la forma de receptor de alta afinidad, fundamentalmente localizada en el sistema nervioso central, se denominaría  $A_{1A}$ , y que la forma de baja afinidad, fundamentalmente presente en tejidos periféricos, se llamaría  $A_{1B}$  (Gustafsson et al., 1990).

Mediante experimentos de unión de ligandos ("binding") del agonista no selectivo, NECA, en presencia de CADO (selectivo para  $A_1$ ) se puede poner de manifiesto la presencia del subtipo  $A_2$ . Estudios posteriores de unión de radioligandos y de actividad adenilato ciclasa demostraron la existencia de un centro menos afín de unión de NECA, que difería de los subtipos  $A_1$  y  $A_2$ . Este centro estaba asociado a estimulaciones de la actividad adenilato ciclasa y presentaba una distribución tisular y un orden de afinidad por agonistas y antagonistas bien diferenciados del subtipo  $A_2$  (Daly et al., 1983; Londos et al., 1983). El nuevo centro tomó entidad propia, definiéndose como el receptor  $A_{2b}$ , para diferenciarlo del anteriormente identificado, que pasó a denominarse  $A_{2a}$  (Bruns et al., 1986). Tras la clonación de ambos subtipos desaparecieron las opiniones favorables a considerar el receptor  $A_{2b}$  como un estado de baja afinidad del receptor  $A_{2a}$ .

Se ha sugerido que los receptores de adenosina presentes en las uniones neuromusculares

del músculo de rana (Ribeiro and Sebastiao, 1987) y en el diafragma de rata (Sebastiao and Ribeiro, 1988), los cuales median la inhibición de la neurotransmisión, podrían ser distintos de los subtipos  $A_1$  y  $A_2$  descritos. Ribeiro y Sebastiao (1986) sugirieron la denominación de subtipo  $A_3$  para esta clase de receptores de adenosina. Los resultados encontrados por Blakeley et al (1988) al estudiar el receptor de vasos deferentes eran compatibles con la idea del subtipo  $A_3$  descrito por Ribeiro y Sebastiao (1987). El orden de potencia de diferentes análogos de la adenosina para este nuevo subtipo difiere de los anteriores y parece estar asociado a canales de  $Ca^{2+}$ . El receptor está situado en la membrana presináptica e inhibe la liberación de neurotransmisores. La hipótesis de la existencia de este receptor ha sido polémica, y ha sido puesta en duda por diferentes investigadores (Fredholm and Dunwiddie, 1988 b). Todas las evidencias que se tienen acerca de este subtipo de receptor provienen de estudios en que se han usado análogos de adenosina, mientras que el efecto de los nucleótidos de adenina no se ha probado rigurosamente. Se ha sugerido que el perfil de potencia de ciertos agonistas y antagonistas observado para el subtipo  $A_3$  en las uniones neuromusculares, puede corresponder a un receptor  $A_{1A}$  (Gustafsson et al., 1990). Por otro lado, existen indicios de que el receptor  $A_3$  descrito por Ribeiro y Sebastiao (1986) es similar al receptor purinérgico  $P_3$  propuesto por Shinozuka et al. (1988). Actualmente existe una cierta ambigüedad respecto a los receptores de adenosina, debido a la clonación de un nuevo subtipo de receptor que se ha denominado también  $A_3$ . El cDNA se ha clonado en rata (Zhou et al., 1992), en hombre (Salvatore et al., 1993) y en oveja (Linden et al., 1993). El clon de rata parece diferir ligeramente respecto al resto, tanto en secuencia aminoacídica como en distribución tisular, pero los tres clones se incluyen en el mismo subtipo y ya han sido identificados como responsables de diferentes efectos fisiológicos (Carruthers and Fozard, 1993a; Ramkumar et al., 1993). La principal característica de este receptor es la baja afinidad por los antagonistas clásicos en el clon ovino y humano, que es prácticamente nula en el clon de rata. Es evidente que la distribución tisular de este receptor no coincide con la descrita por Ribeiro para su  $A_3$ , por lo que en estos momentos existen dos receptores diferentes denominados de igual manera (Carruthers and Fozard, 1993 b; 1994; Ribeiro and Sebastiao, 1994; Beaven et al., 1994).

Recientemente, se ha descrito un centro de unión de adenosina que presenta alta afinidad por el ligando CV1808 y es débilmente bloqueado por xantinas, al cual se le ha denominado subtipo  $A_4$  (Cornfield et al., 1992). Se ha demostrado que este receptor es el responsable de la activación de la conductancia de  $K^+$  en neuronas de estriado y células musculares de arterias coronarias. Este receptor no está asociado a proteínas G, media su efecto vía canales de  $K^+$ , diferenciándose por lo tanto de los subtipos  $A_1$  y  $A_2$ . La existencia de este receptor ya ha sido puesta en duda por Luthin y Linden (1994), al sugerir que el orden de potencia es similar al obtenido para un receptor  $A_{2b}$  expresado en células CHO. De todas maneras no existe ningún tipo de información estructural o molecular de este nuevo subtipo de receptor.

Finalmente, se ha puesto también de manifiesto la existencia de un centro de unión de adenosina de baja afinidad localizado en la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. A este centro de unión de adenosina se le ha denominado centro P, en referencia al requerimiento de ligandos con el anillo de purina intacto. Se ha descrito en plaquetas, hígado de rata, células del tiroides bovino (Londos and Wolff, 1977), cerebro de rata (Johnson and Shoshani, 1990), cerebro bovino (Yeung and Johnson, 1990) y en leucocitos humanos (Marone et al., 1990). Para producir la activación de este centro de unión se requieren elevadas concentraciones, no fisiológicas, de adenosina. La activación del centro P provoca la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (Londos and Wolff, 1977). El papel fisiológico del centro P está aún sin esclarecer (Londos et al., 1983).

#### *A.4.3.2. Estudios estructura actividad.*

Se han empleado técnicas de correlación entre estructura de un ligando (características químicas) y su actividad (funcionalidad biológica) para obtener información útil sobre la estructura de un receptor y de la naturaleza física de las fuerzas que rigen la interacción ligando receptor. Por otro lado, estas técnicas pueden conducir al diseño de compuestos químicos artificiales con las mismas características del ligando natural (capacidad de reconocimiento del receptor y de transducir la señal), y que posean mayor afinidad, selectividad y estabilidad. En el caso de los receptores de adenosina, estos estudios han permitido la síntesis de innumerables agonistas y antagonistas que cumplen estas tres condiciones (Van Galen et al., 1992).

El progreso excepcional observado en el área periclínica, tanto a nivel químico como en el biológico, no ha implicado un progreso de forma paralela en el área clínica. Muy pocos agonistas y antagonistas poseen cualidades terapéuticas claras, por lo que ninguno de ellos ha podido ser empleado con éxito en casos clínicos. El único compuesto aprobado con acciones terapéuticas reconocidas vía interacción con receptores de adenosina es la adenosina por sí misma. La adenosina se usa para el tratamiento de la taquicardia supraventricular (Pantely and Bristow, 1990), cardioprotector en la reperfusión postisquémica (Pitarys, et al 1991), en soluciones cardioplégicas para disminuir el grado de contracciones isquémicas (Lasley et al., 1990), estando designada como producto de la categoría 1A por la U.S. Food and Drug Administration, lo que significa que es un fármaco indicado en caso de necesidad médica extrema.

Las razones del limitado progreso en la aplicación de la capacidad terapéutica de la adenosina y de sus agonistas se deben a la amplia ubicuidad de las acciones de la adenosina (y ATP) en gran variedad de sistemas tisulares, la disponibilidad de ligandos que son solubles y biodisponibles de forma oral, la falta de conocimiento de enfermedades que implican una etiología purinérgica, y finalmente, la incapacidad de dirigir los agentes en función de las necesidades terapéuticas.

##### *A.4.3.2.1. Agonistas de los receptores de adenosina.*

La adenosina ha sido ampliamente empleada en el estudio de los receptores de adenosina desde que se describieron las acciones cardiovasculares de las purinas hace 60 años. Sin embargo, la labilidad metabólica de la adenosina limitaba su uso en multitud de estudios, tales como los de unión de radioligandos a los receptores de adenosina (Malbon et al., 1978; Schwabe et al., 1979; Newman et al., 1980). Por otro lado, la adenosina como tal presenta multitud de centros de unión aparte de sus receptores, entre ellos cabe destacar las enzimas que la metabolizan (adenosina desaminasa, S-adenosilhomocisteína hidrolasa, adenosina quinasa) y sus diferentes transportadores. Se necesitaban, por lo tanto, análogos de la adenosina que presentaran alta afinidad para sus receptores y de forma simultánea fueran pobres o nulos substratos de las enzimas que la metabolizan y de los transportadores de nucleósidos.

Todos los agonistas de la adenosina conocidos hasta el momento poseen una estructura química estrechamente emparentada con la molécula de adenosina (6-amino-9- $\beta$ -D-ribofuranosil-9H-purina) (Tabla III), donde unas cuantas modificaciones de esta estructura son determinantes para estos agonistas. Esto es especialmente cierto en la estructura de la ribosa, donde tan sólo la posición 5' es susceptible de ser substituida. De la misma manera, las modificaciones del anillo purínico (adenina) está limitada a las posiciones N<sup>6</sup> y C<sup>2</sup>, rindiendo por ambas vías agonistas selectivos para los diferentes subtipos de receptores de adenosina. Los derivados de adenosina que están substituidos en N<sup>6</sup> tales como el CHA, CPA y R-PIA, el análogo 2-CADO substituido

en C<sup>2</sup>, el análogo NECA sustituido en la posición 5' de la ribosa y el análogo CGS 21680 sustituido en C<sup>2</sup> y en 5', han constituido instrumentos de gran valor en la determinación de la farmacología y clasificación de los receptores de adenosina. Las estructuras de los derivados de adenosina sustituidos en N<sup>6</sup>, C<sup>2</sup> y 5' se muestran en la tabla III.

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 (inosina) da lugar a compuestos inactivos (Bruns, 1980). La doble sustitución del grupo amino también disminuye la actividad, mientras que la monosustitución rinde generalmente agonistas potentes y selectivos de A<sub>1</sub>, probablemente debido al establecimiento de un puente de hidrógeno con el receptor (Bruns, 1980). Los análogos de la adenosina sustituidos en N<sup>6</sup> poseen por regla general una mayor selectividad por el subtipo A<sub>1</sub> de receptor de adenosina. Los N<sup>6</sup>-cicloalquil sustituidos tales como el CPA y el CHA son entre 400 y 800 veces más selectivo por el subtipo A<sub>1</sub> que por el A<sub>2a</sub> (Moos et al., 1985). Las N<sup>6</sup>-biscicloalquiladenosinas son aún más selectivas; entre ellas destaca la S-ENBA (Trivedi et al., 1989), la cual es unas 4700 veces más selectiva por el subtipo A<sub>1</sub> que por el A<sub>2a</sub>. Las sustituciones combinadas en las posiciones N<sup>6</sup> y C<sup>2</sup> producen compuestos como el 2-cloro-CPA (CCPA) que es 1500 veces más selectivo por el subtipo A<sub>1</sub> (Lohse et al., 1989). Otros agonistas importantes del receptor A<sub>1</sub>, también N<sup>6</sup> sustituidos, son la R-PIA y su derivado AHPIA (Linden, 1984), que permite la yodación y es fotorreactivo; el ABA también puede ser yodado y derivatizado a AzBA, para su empleo en estudios de fotomarcaje (Choca et al., 1985).

El análogo de adenosina 5' sustituido, NECA, ha sido ampliamente usado para definir respuestas tisulares mediadas por la activación de receptores A<sub>2</sub> (Williams, 1989 a; Jacobson et al., 1991). Este análogo, sin embargo, no es selectivo en su interacción con los receptores de adenosina, siendo aproximadamente equipotente (K<sub>i</sub> ≈ 10 nM) para el receptor A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> de adenosina (Bruns et al., 1986).

Otras modificaciones en la ribosa, especialmente en las posiciones 2' y 3', afectan de una manera u otra al sitio de unión. La presencia del grupo hidroxilo en 2' es esencial para la afinidad y la actividad, mientras que los hidroxilos en 3' y 5' parecen serlo para la actividad pero no para la afinidad (Taylor et al., 1986).

La selectividad por el receptor A<sub>2a</sub> se consigue a través de sustituciones en posición C<sup>2</sup> (Tabla III). Sustituyentes pequeños en C<sup>2</sup>, como el caso de la CADO, no son de gran utilidad, pues se obtienen productos poco potentes y de escasa selectividad. La inclusión de un grupo fenilamino rinde el análogo 2-(arilamido)adenosina, CV1808 (Kawazoe et al., 1980), el cual, aunque moderadamente potente (K<sub>i</sub> ≈ 100 nM) para el receptor A<sub>2a</sub>, posee una modesta selectividad (5 veces) con respecto al receptor A<sub>1</sub> (Bruns et al., 1986). El análisis de los 2-(2-feniletil)amino derivados en C<sup>2</sup> a partir de la estructura inicial de la NECA (derivado de la adenosina modificado en posición 5'), permitieron la identificación de un derivado carboxílico, el CGS 21680 (Hutchinson et al., 1990), el cual es 140 veces más selectivo por el receptor A<sub>2a</sub> que por el A<sub>1</sub>, con una potencia relativamente alta (K<sub>i</sub> = 10-20 nM), constituyendo el derivado más empleado actualmente en experimentos de unión (Jarvis et al., 1989). Un derivado de este compuesto, el PAPA-APEC, es susceptible de yodación (Figura X), pudiéndose emplear en experimentos de fotomarcaje (Barrington et al., 1989a; 1990). Otras modificaciones estructurales en posición C<sup>2</sup> llevaron al desarrollo de diferentes 2-alcoxiadenosinas con similares afinidades y selectividad (Ueeda et al 1991 a) y 2-alquiladenosinas, con mayor afinidad, pero menor selectividad (Abiru et al., 1991). Curiosamente estos agonistas parecen tener una selectividad mucho mayor en ensayos in vivo que en ensayos de unión, por ejemplo el MPEA es más selectivo en ensayos funcionales que en ensayos de unión (Ueeda, 1991 b). Este comportamiento puede ser debido a diferencias farmacodinámicas o farmacocinéticas (penetración, distribución, acoplamiento

The diagram shows the chemical structure of adenosine, consisting of a purine ring system attached to a ribose sugar ring. The purine ring has an NH group at position 6, which is substituted with R<sub>1</sub>. The nitrogen at position 2 is substituted with R<sub>2</sub>. The ribose sugar has hydroxyl groups at positions 2' and 3', and the C5' position is substituted with R<sub>3</sub>.

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Selectividad
Adenosina	H	H	CH <sub>2</sub> OH	-
CPA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub>
CHA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub>
S-ENBA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub>
R-PIA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub>
I-AHPIA		N <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub>
I-ABA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub> > A <sub>3</sub>
I-APNEA		H	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub> > A <sub>3</sub>
CV1808	H		CH <sub>2</sub> OH	A <sub>2a</sub> > A <sub>1</sub>
MPEA	H		CH <sub>2</sub> OH	A <sub>2a</sub>
CADO	H	Cl	CH <sub>2</sub> OH	A <sub>1</sub> = A <sub>2a</sub>
NECA	H	H	CONH-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	A <sub>1</sub> = A <sub>2a</sub> > A <sub>2b</sub>
CGS21680	H		CONH-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	A <sub>2a</sub>
I-PAPA-APEC	H		CONH-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	A <sub>2a</sub>
I-ABMECA			CONH-CH <sub>3</sub>	A <sub>3</sub> = A <sub>1</sub>

Tabla III. Agonistas de los receptores de adenosina.

receptor-efector, spare receptors).

Por otro lado, actualmente se dispone de muchísima menos información a cerca del receptor  $A_{2b}$ , para el cual no existe aún un ligando específico ni afin. La caracterización de este subtipo de receptor de adenosina se continúa realizando mediante la unión o el efecto fisiológico producido por la NECA, su agonista más afin ( $K_d=1 \mu\text{M}$ ).

Para el receptor  $A_3$  existen, sin embargo, agonistas y antagonistas afines, si bien no específicos. Se han utilizado ya diferentes ligandos en su caracterización, como el [ $^{125}\text{I}$ ]APNEA (Zhou et al., 1992), el [ $^{125}\text{I}$ ]ABA (Linden et al., 1993), y más recientemente el [ $^{125}\text{I}$ ]ABMECA (Olah et al., 1994). Todos estos ligandos tienen la característica de unirse con alta afinidad al receptor  $A_1$ , lo que sugiere una similitud en la estructura del centro de unión, aunque existen diferencias importantes en los aminoácidos implicados, como se comentará más adelante. La principal diferencia entre ambos subtipos de receptores estriba en la unión de antagonistas.

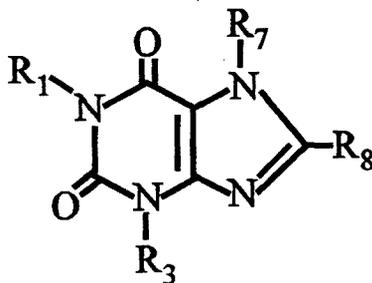
#### *A.4.3.2.2. Antagonistas de los receptores de adenosina.*

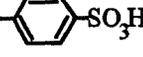
El prototipo de antagonistas de los receptores de adenosina han sido desde siempre las xantinas naturales: teofilina (1,3-dimetilxantina) y la cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Sattin and Rall, 1970). Como antagonistas de adenosina, las xantinas simples poseen baja selectividad y muy poca afinidad, por otro lado, pueden actuar bioquímicamente a través de otros mecanismos, tales como la inhibición de las fosfodiesterasas y la movilización de calcio (Williams, 1989a).

Las sustituciones combinadas en las posiciones 1, 3 y 8 pueden aumentar espectacularmente la afinidad e impartir cierta selectividad (Tabla IV). La afinidad de los derivados de xantinas se incrementa de forma proporcional al aumento de longitud de la cadena en las posiciones 1 y 3, siendo las sustituciones 1,3-dipropil las más óptimas en este sentido, ya que proporcionan un aumento de 19 veces en la afinidad por el receptor  $A_1$ . El receptor  $A_1$ , con respecto al subtipo  $A_2$ , posee mayor tolerancia en cuanto a la longitud de la cadena en posición 3. Por ejemplo, el derivado I-BW-A844U (Linden, 1991) es 1700 veces más selectivo por  $A_1$ , mientras que el compuesto DPCPX es aproximadamente 740 veces más selectivo. Las sustituciones en la posición 7 provocan, generalmente, un descenso de la afinidad; por ejemplo, la cafeína es menos potente que la teofilina (Bruns, 1981).

Las modificaciones en las posiciones 1,3 y 7 permiten diferenciar hasta cierto punto entre los receptores  $A_1$  y  $A_2$  (Tabla IV). La sustitución de un grupo metilo en  $N^7$  parece que es menos desfavorable en la interacción con el receptor  $A_2$  que con el  $A_1$ ; mientras que la sustitución de un grupo alquil en  $N^1$  incrementa la afinidad por el receptor  $A_2$  más que la del  $A_1$ . Por otro lado, las sustituciones en  $N^3$  pueden ser más favorables para la afinidad por el receptor  $A_1$ . Esto ha permitido el desarrollo de algunos derivados de xantinas moderadamente selectivos y afines por el receptor  $A_2$ , como por ejemplo el CHC (Shamin et al., 1988). La falta de antagonistas potentes y selectivos por el receptor  $A_2$  continúa siendo el mayor obstáculo en la caracterización farmacológica del subtipo  $A_2$ .

El mayor incremento en la afinidad de los antagonistas de adenosina proviene de las sustituciones de radicales hidrofóbicos en la posición 8, como es el caso de la 8-PT, el cual es 100 y 30 veces más potente por los receptores  $A_1$  y  $A_2$  respectivamente, con respecto a la teofilina. Un problema esencial de estos compuestos es su escasa solubilidad en agua. En contrapartida, los derivados que presentan mayor solubilidad (8-SPT) no son excesivamente potentes. Se han obtenido también xantinas funcionalizadas (XAC, xantinaminocongéner) para el marcaje de receptores  $A_1$  (Jacobson et al., 1985). Se ha postulado que los sustituyentes en la posición 8 de la xantina ocupan el mismo lugar que los sustituyentes de la posición 6 de la adenosina en el

**A**

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	Selectividad
Teofilina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	-
IBMX	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	-
Cafeína	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	-
CHC	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		A <sub>2a</sub>
8-PT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		A <sub>1</sub>
8-SPT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		-
XAC	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H		A <sub>1</sub>
DPCPX	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H		A <sub>1</sub> > A <sub>2a</sub>
KW-3902	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H		A <sub>1</sub>
I-BW-A448U	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> 	H	H	A <sub>1</sub>

**B**

CGS 15943

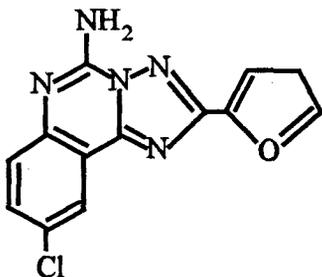
A<sub>2a</sub>

Tabla IV. Antagonistas de los receptores de adenosina, tanto derivados de xantina (*A*), como no derivados (*B*).

centro de unión del receptor (Van Galen et al., 1990). Esta suposición ha sido asumida también para el subtipo  $A_3$  (Linden et al., 1993), el cual presenta una afinidad muy baja para el DPCPX, sustituido en 8 por un ciclopentil, pero presenta mayores afinidades para antagonistas que presentan un anillo en esa posición. Además se pueden llegar a obtener afinidades realmente altas si al anillo bencénico se le añade un grupo carboxílico y se sustituyen las posiciones 1 y 3 con grupos hidrofóbicos, como es el caso del IABOPX (Linden et al., 1993).

En contraste con los cientos de derivados de xantinas que han sido sintetizados y estudiados como antagonistas de los receptores  $A_1$  y  $A_2$ , en los últimos años se han identificado como antagonistas un menor número de compuestos no derivados de xantinas. Entre éstos destacan una serie de compuestos heterocíclicos, las triazoquinazolininas, triazoloquinazolininas y los derivados de la adenina (Van Galen et al., 1992); el más utilizado es el CGS15943, antagonista relativamente selectivo del subtipo  $A_{2a}$ .

#### *A.4.3.3. Caracterización bioquímica y biología molecular de los receptores de adenosina.*

Los receptores  $A_1$  y  $A_2$  de adenosina son proteínas diferentes ya que presentan diferencias en el peso molecular, incluso después de ser desglicosiladas, y también presentan diferencias en su mapa peptídico generado por tratamiento con proteasas (Barrington et al., 1990). La subunidad de unión del receptor  $A_1$  de adenosina se identificó inicialmente en cerebro de rata y en adipocitos como una proteína de 38 kDa de peso molecular. Esta identificación se llevó a cabo por separación en PAGE-SDS del receptor unido covalentemente a un agonista marcado radiactivamente, el [ $^{125}$ I]APNEA, vía un compuesto químico fotoactivable de carácter bifuncional (SAMPAH), que se une covalentemente por un extremo al agonista y por el otro al receptor de adenosina (Stiles et al., 1985). Por otro lado, la unión covalente del agonista marcado al receptor también puede ser directa, si el ligando posee un grupo arilazido y es expuesto a luz ultravioleta de alta energía, la cual induce la unión covalente del ligando al receptor. Esta técnica de fotomarcaje directo es preferida por su mayor eficiencia, una diez veces superior al fotomarcaje indirecto. Los agonistas del receptor  $A_1$  de adenosina más empleados en el fotomarcaje directo son: [ $^{125}$ I]AzPNEA (Stiles et al., 1986); [ $^{125}$ I]AzBA (Choca et al., 1985); [ $^{125}$ I]AHPIA (Klotz et al., 1985); entre los antagonistas se encuentran: [ $^{125}$ I]PAPA-XAC (Stiles and Jacobson, 1986) y [ $^{125}$ I]AzBW-A827U (Linden et al., 1987). Por técnicas de fotomarcaje se detecta una proteína de 38 kDa de peso molecular en membranas de córtex cerebral de buey (Barrington et al., 1989a) y en la línea celular de musculatura lisa DDT<sub>1</sub> MF-2 (Ramkumar et al., 1991). El peso molecular de la subunidad de unión del receptor  $A_1$  de adenosina presente en testículo de rata es ligeramente mayor (42 kDa); este incremento en el peso molecular puede revelar diferencias en la glicosilación del receptor (Nakata, 1990; Stiles et al., 1986). En extractos purificados de receptor  $A_1$  de adenosina de cerebro de rata (Nakata, 1989) y de buey (Olah et al., 1990), el marcaje por fotoafinidad revela la presencia de proteínas de peso molecular de 34 y 37 kDa respectivamente.

El receptor  $A_1$  de adenosina es una glicoproteína, tal y como queda demostrado por tratamiento del receptor con endo- y exoglicosidasas (Stiles, 1986; Nakata, 1990; Olah et al., 1990). Contiene una cadena de carbohidratos de tipo complejo, de la que se sabe que no es una cadena rica en manosas. En su estado desglicosilado el peso molecular del receptor es de 32 kDa, siendo éste un patrón observado en multitud de tejidos y de organismos (Olah et al., 1990; Stiles, 1986; Nakata, 1990).

Con posterioridad, se ha diseñado un agonista del receptor  $A_{2a}$  de adenosina con capacidad de unirse covalentemente, el [ $^{125}$ I]PAPA-APEC, que puede ser empleado en

experimentos de fotomarcaje indirecto (Barrington et al., 1989a) y fotomarcaje directo (Barrington et al., 1990). El primer fotomarcaje del receptor  $A_{2a}$  de adenosina se llevó a cabo en membranas de estriado de cerebro de conejo y humano, así como en membranas de células PC12 y eritrocitos de rana; reveló la presencia de una banda que presenta las características farmacológicas del receptor  $A_{2a}$  de adenosina y un peso molecular de 45-47 kDa, dependiendo de las membranas de origen (Barrington et al., 1989a; Barrington et al., 1990). Recientemente se han realizado mapas peptídicos del receptor  $A_{2a}$  de adenosina fotomarcado, determinándose el centro de unión covalente en el quinto dominio de transmembrana (Piersen et al., 1994 a). Mediante el tratamiento con glicosidasas del receptor fotomarcado se ha podido determinar que el receptor  $A_{2a}$  presenta una mezcla heterogénea de carbohidratos de tipo complejo y de manosas (Barrington et al., 1990). Además se ha podido observar que el subtipo  $A_{2a}$  es susceptible de proteólisis, y ésta provoca una mayor sensibilidad de la unión del ligando a la presencia de análogos de GTP. Estudios más recientes con este último subtipo, han demostrado que puede retener su capacidad de unión de ligandos, aún estando desglicosilado y truncado su extremo C-terminal (Piersen et al., 1994 a).

Por otro lado, se han realizado numerosos estudios de solubilización del receptor  $A_1$ , que han permitido realizar análisis hidrodinámicos y cinéticos. El receptor  $A_1$  se solubiliza unido a su proteína G, puesto que presenta unas constantes hidrodinámicas correspondientes a una proteína de 250 kDa (Yeung et al., 1987) y una marcada sensibilidad a los análogos de GTP, como el Gpp(NH)p, que desacoplan el receptor de la proteína G (Casadó et al., 1990). Los detergentes más utilizados en los estudios de solubilización son el colato, el desoxicolato, la digitonina y el CHAPS, o incluso combinaciones entre ellos (Nakata, 1990; Casadó et al., 1990). Las condiciones de solubilización son, en general, las comúnmente utilizadas en la solubilización de receptores, aunque es habitual el uso de suspensiones concentradas de membranas, lo que sugiere un papel de los fosfolípidos endógenos en la estabilización de los receptores solubles (Casadó et al., 1991). Otra técnica utilizada para la determinación del tamaño del receptor  $A_1$  soluble es su inactivación por irradiación con electrones de alta energía, obteniéndose un valor de masa molecular para la unidad funcional del receptor de 63-79 kDa (Frame et al., 1986; Reddington et al., 1987). Esta masa sugiere que la unidad funcional puede ser un dímero, cuyos monómeros coincidirían con las subunidades detectadas por técnicas de fotomarcaje. Mucho menos se conoce del resto de subtipos de receptores de adenosina solubles, únicamente se ha descrito la solubilización del subtipo  $A_{2a}$  con el fin de aislarlo de otros centros de unión de NECA (Lorenzen et al., 1992; Schwabe et al 1993). Por supuesto, el único receptor de adenosina que ha sido purificado a homogeneidad, ha sido el subtipo  $A_1$ , utilizando columnas de afinidad en las que el soporte (agarosa) está unido tanto a agonistas, como el ABA (Linden et al., 1989), como a antagonistas, como el PAPA-XAC (Nakata, 1989). Esta última purificación rinde un preparado con una actividad específica muy próxima a la máxima teórica (24 nmol/mg proteína).

La modificación química selectiva de diferentes residuos aminoácidos ha permitido obtener información directa de los aminoácidos implicados en la unión, tanto de agonistas, como de antagonistas, al receptor  $A_1$ . El tratamiento del receptor con agentes modificadores de cisteínas, como el NEM, provoca la pérdida de afinidad del receptor por los agonistas, demostrando que los grupos -SH son importantes en la interacción receptor-proteína G (Allende et al., 1991). Por el contrario, este reactivo no modifica la unión de agonistas al receptor  $A_{2a}$ , por lo que ha sido utilizado para inactivar los receptores  $A_1$  en las preparaciones que presentan ambos subtipos (Yeung and Green, 1984). Los agentes que parecen afectar al subtipo  $A_{2a}$  son los agentes reductores de puentes disulfuro, como el DTT, o el mercaptoetanol (Jacobson et al., 1992). Por otra parte el uso de reactivos específicos de histidinas, como el DEPC, indica la importancia de

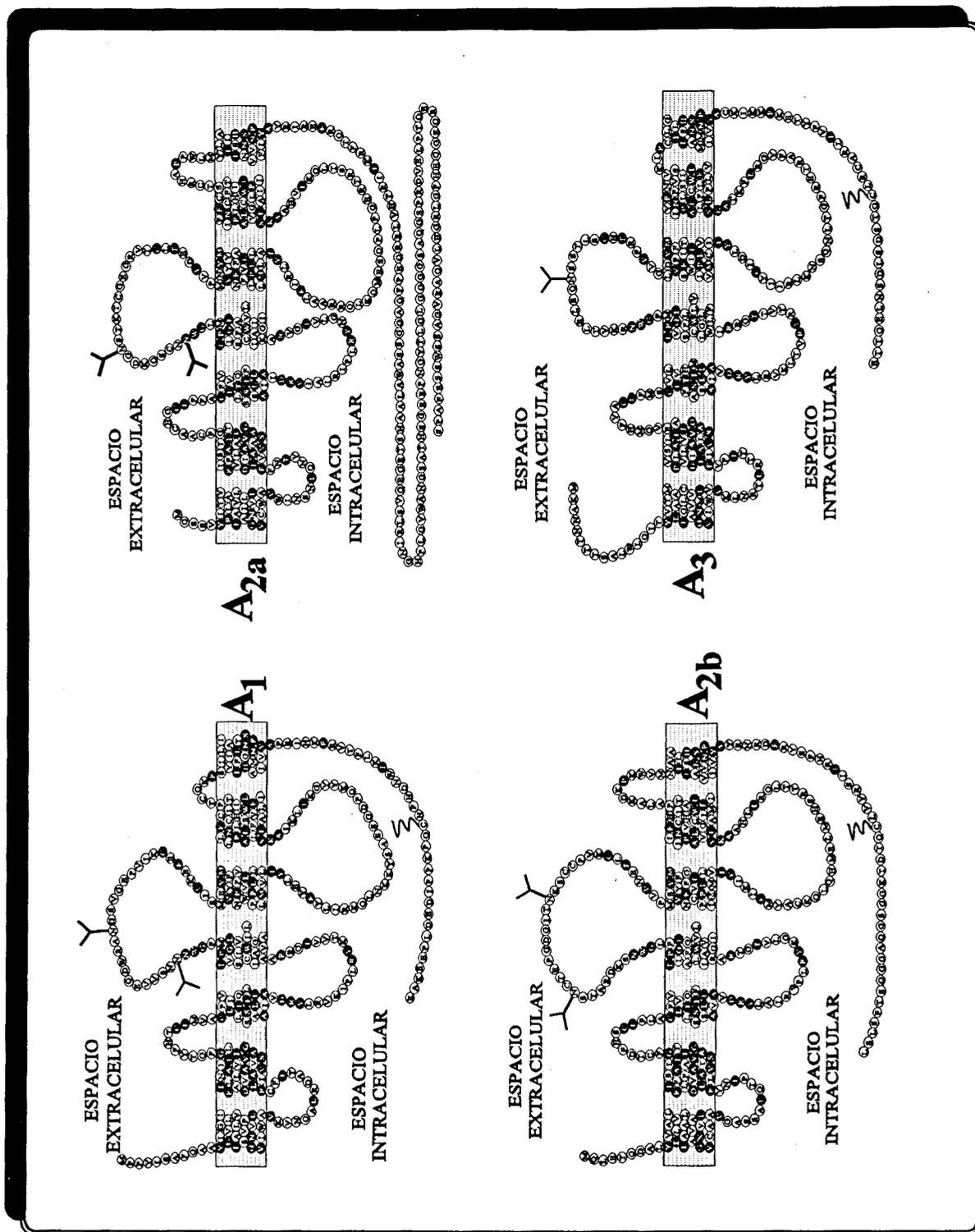
dos (Klotz et al., 1988) o tres (Allende et al., 1992) de estos residuos en la unión del ligando.

Con la excepción del subtipo  $A_4$ , los receptores de adenosina se encuentran encuadrados dentro de la gran familia de receptores acoplados a proteína G. Estructuralmente estos receptores consisten en una glicoproteína de 320-420 aminoácidos con siete dominios transmembrana. Dos miembros de esta familia, RDC7 y RDC8, han sido clonados (Libert et al 1989) y caracterizados respectivamente como los subtipos  $A_1$  (Libert et al., 1991; Mahan et al., 1991; Reppert et al., 1991) y  $A_2$  (Maenhaut et al., 1990) de receptores de adenosina. Más recientemente, se han clonado los subtipos  $A_{2a}$  (Furlong et al., 1992) y  $A_{2b}$  (Stehle et al., 1992; Pierce et al., 1992; Rivkees and Reppert, 1992) del receptor  $A_2$  de adenosina. Por otro lado y hasta el momento, los subtipos  $A_{1a}$  y  $A_{1b}$  del receptor  $A_1$  de adenosina propuestos por Gustafsson (1990), aún no han sido clonados. Cronológicamente, las caracterización e identificación del transcrito de cDNA de RDC8 como un receptor  $A_2$  se describió antes de la identificación del cDNA de RDC7 como un gen que codificaba para un receptor  $A_1$ . Con posterioridad, se aisló de una biblioteca de cerebro de rata un clon, R226, que codificaba para otro receptor de adenosina, el denominado subtipo  $A_3$  (Zhou et al., 1992). Seguidamente, también se aisló este mismo cDNA en oveja y hombre (Linden et al., 1993; Sajjadi and Firestein, 1993; Salvatore et al., 1993).

Estudiando las secuencias aminoacídicas de todos los receptores clonados, se encuentra que la variación de un mismo receptor entre diferentes especies (receptores ortólogos) es mínima, al menos en el caso de los subtipos  $A_1$ ,  $A_{2a}$  y  $A_{2b}$ , donde esta homología se encuentra entre un 85 % y un 91 %. Estos valores aumentan considerablemente si tan sólo se comparan los dominios transmembrana de los receptores, puesto que las variaciones se localizan en los dominios no implicados en la unión del ligando (Tucker et al., 1992). Sorprendentemente, el subtipo  $A_3$  presenta una homología de secuencia inicialmente baja entre los tres clones encontrados, siendo de un 72 % entre el receptor de rata y el ovino o el humano (que son mucho más similares entre sí, homología del 85 %), lo que sugiere que el clon de rata ha podido sufrir cambios mutacionales recientes o que estos clones corresponden a dos subtipos de receptores  $A_3$ .

Analizando las secuencias de los cuatro receptores de adenosina clonados (Figura 7), se puede observar una marcada homología en determinados puntos de la secuencia aminoacídica, como por ejemplo, el par de aminoácidos GN en el dominio transmembrana 1 (TM1), la secuencia LXXXD en el TM2, la secuencia DRY en el segundo "loop" intracelular, las cisteínas presentes en segundo y tercer "loop" extracelular, las cuales pueden estar involucradas en el establecimiento de puentes disulfuro, la secuencia WXP en el TM6, y NP en el TM7.

La mayor identidad se encuentra en los dominios transmembrana, concretamente en TM2 (VSLAXADXAVG), TM3 (SIXLLAXA), TM5 (YMVXXXF y LXPLXXM). Esto está ligado al hecho de que estos y posiblemente otros dominios transmembrana constituyen el centro de unión del ligando, y que algunos de estos aminoácidos conservados están involucrados en el reconocimiento del ligando. Los receptores de adenosina carecen de un ácido aspártico en la posición correspondiente al aminoácido 113 de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, localizado en el hueco que forman los siete dominios transmembrana. Este aminoácido se encuentra presente en todos los receptores que tienen la capacidad de unir aminas catiónicas tales como las catecolaminas, acetilcolina y serotonina. En los receptores de adenosina, este residuo de ácido glutámico, que está actuando de contraion, ha sido sustituido por una valina, ya que la adenosina no presenta carga a pH fisiológico, aunque el centro de unión también se encuentra localizado en el hueco formado por las siete  $\alpha$ -hélices en el interior de la membrana. La distribución de estas  $\alpha$ -hélices en la membrana permite la coexistencia de dos entornos en el centro de unión, uno



**Figura 7.** Secuencia aminoacídica de los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub> y A<sub>3</sub> clonados en rata. Los receptores están dibujados de acuerdo con la distribución de los siete dominios transmembrana característica de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Los aminoácidos idénticos en los cuatro subtipos de receptores se indican en negro.

hidrofílico y otro hidrofóbico, donde cada uno de ellos poseería un residuo de histidina (van Galen et al., 1992), tal y como se intuía por experimentos de modificación química (Allende et al., 1992). Curiosamente, el receptor  $A_3$  carece de la histidina localizada en el sexto dominio transmembrana, conservando la del séptimo dominio, la cual podría ser vital para la unión del ligando (Linden et al., 1993). En estudios de mutagénesis dirigida del receptor  $A_1$ , se ha demostrado que la sustitución de la histidina presente en el séptimo dominio transmembrana implica una pérdida casi total de la unión específica de agonistas y antagonistas. Sin embargo, si la histidina sustituida es la del sexto dominio, la unión específica disminuye, pero la afinidad por los agonistas se mantiene, aunque la del antagonista XAC disminuye ligeramente (Olah et al., 1992).

Los receptores  $A_1$ ,  $A_{2a}$  y  $A_{2b}$  poseen dos secuencias consenso susceptibles de N-glicosilación (NXS), las cuales se encuentran localizadas en el segundo "loop" extracelular, mientras que el receptor  $A_3$  posee tan sólo una en esta región (Figura 7). Este es un hecho bastante sorprendente pues la mayoría de receptores acoplados a proteínas G presentan puntos de N-glicosilación en su extremo N-terminal (Svarese and Fraser, 1992), sin embargo, a la vista de la secuencia aminoacídica, únicamente el subtipo  $A_3$  podría ser N-glicosilado en tal dominio (Libert et al., 1991; Linden et al., 1993).

Una cisteína localizada en el extremo C-terminal de los subtipos  $A_1$ ,  $A_{2b}$  y  $A_3$  se presenta potencialmente como un punto de palmitoilación, donde el ácido graso quedaría anclado en la membrana plasmática para formar el cuarto "loop" intracelular, posiblemente implicado en la interacción con la proteína G. Por otro lado, se ha demostrado que el tercer "loop" intracelular y las zonas adyacentes de los dominios transmembrana V y VI son los determinantes importantes en el reconocimiento de la proteína G (Dohlman et al., 1991).

Los puentes disulfuro juegan un papel importante en la integridad del centro de unión del receptor  $\beta_2$  adrenérgico (Dohlman et al., 1990) y de la rodopsina (Karnik et al., 1988), aunque no formen parte de él. En el caso del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, el puente disulfuro se establece entre las cisteínas 106 y 190, las cuales se hallan muy conservadas en la secuencia del resto de receptores de la superfamilia. Todos los subtipos de receptores de adenosina presentan estas cisteínas, aunque, como ya se ha comentado, su susceptibilidad a reactivos específicos de grupos SH es diferente, al menos entre los subtipos  $A_1$  y  $A_{2a}$  (Allende et al., 1991).

Una diferencia notable entre la región C-terminal de los receptores  $A_1$ ,  $A_{2b}$ ,  $A_3$  y el receptor  $A_{2a}$  es la abundancia de residuos serina y treonina. En esta región, el subtipo  $A_{2a}$  presenta varios sitios susceptibles de actuar como diana de proteínas quinasas y ser, por lo tanto, fosforilados. Sin embargo, los subtipos  $A_1$ ,  $A_{2b}$  y  $A_3$  tan sólo presentan un potencial sitio de fosforilación (T) en esta región, en contraste, se observan sitios adicionales en el tercer "loop" intracelular.

#### *A.4.3.4. Distribución tisular de los receptores de adenosina.*

Se han empleado diferentes técnicas para determinar la abundancia relativa de los receptores de adenosina en diferentes tejidos. Inicialmente se realizaron experimentos de unión utilizando agonistas o antagonistas selectivos o métodos indirectos (Bruns et al., 1986). Se han realizado estudios de fotomarcaje (Klotz et al., 1985; para el subtipo  $A_1$ ) y de autorradiografía (Dragunow et al., 1988, en cerebro; Palacios et al., 1987, en riñón).

Posteriormente, a partir del conocimiento de la secuencia de los diferentes receptores clonados, se ha generalizado el empleo de técnicas inmunocitoquímicas y de biología molecular, puesto que ha sido posible la generación de anticuerpos y se ha ampliado la disponibilidad de

sondas específicas para su identificación por técnicas de Northern Blot (Stehle et al., 1992), o de hibridación in situ (Reppert et al., 1991). En la Tabla V puede verse un resumen de los diferentes datos descritos hasta el momento.

Tejido	A <sub>1A</sub>	A <sub>1B</sub>	A <sub>2a</sub>	A <sub>2b</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>
Cerebro	+++	-	+++	+	+	+
Corteza	+++	-	+/-	nd	+	+
Estriado	+++	-	+++	nd	+	+
Hipotálamo	++	-	-	nd	+	+
Cerebelo	+++	-	-	nd	+	+
Médula esp.	+++	-	-	+	nd	nd
Corazón	-	+	++	+/-	+/-	nd
Pulmón	-	+/-	++	++	+++	nd
Hígado	-	+	+/-	-	+++/-	nd
Riñón	-	+	+	-	+++/-	nd
Timo	-	-	++	-	nd	nd
Bazo	-	+	+	-	+++/-	nd
Esófago	-	-	+	-	nd	nd
Estómago	-	+/-	-	-	nd	nd
Int. delgado	-	-	-	-	nd	nd
Ciego	-	-	-	+++	nd	nd
Int. grueso	-	-	-	+++	nd	nd
Vejiga	-	-	-	+++	nd	nd
Testículo	-	+/-	-	-	++	nd
Epidídimo	-	++	++	-	nd	nd
Próstata	-	-	-	-	nd	nd
Pituitaria	-	-	+	-	nd	nd

Tabla V. Distribución tisular de los diferentes subtipos de receptores de adenosina. (nd. no determinado).

En cuanto a la distribución tisular se pone de nuevo de manifiesto la controversia entorno al receptor A<sub>3</sub>. Si, como se había comentado, los clones de rata y ovino o humano no presentan una homología excesivamente elevada, los estudios de distribución parecen corroborar esta diferencia, puesto que el clon de rata se expresa especialmente en testículos (Zhou et al., 1992), y el ovino lo hace en pulmón y bazo, expresándose mínimamente en testículos (Linden et al., 1993), lo que podría sugerir que estos clones no pertenecen a un mismo subtipo de receptor, ya que estas diferencias de expresión entre especies no se observan en el resto de receptores de adenosina clonados. Por su parte, el clon de A<sub>3</sub> humano se expresa en pulmón e hígado principalmente, pero no en bazo (Salvatore et al., 1993; Sajjadi and Fierstein, 1993), aunque existen discrepancias entre los resultados de ambos autores.

De las diferentes líneas celulares que expresan alguno o varios receptores de adenosina, las más empleadas y, por tanto, las mejor caracterizadas son: DDT1-MF2, que presentan una elevada expresión del subtipo  $A_1$  y menor proporción del  $A_{2a}$  (Ramkumar et al., 1991); PC12, que presenta el subtipo  $A_{2a}$  (Barrington et al., 1989a) y RCCT, células de túbulo colector cortical de riñón que presentan los subtipos  $A_1$  y  $A_{2a}$  (Spielman et al., 1992); RB323, mastocitos que presentan el subtipo  $A_3$  (Ramkumar et al., 1993); y células cromafines de glándula adrenal, que presentan el subtipo  $A_{2b}$  (Casadó et al., 1992).

#### *A.4.3.5. Sistemas efectores acoplados a los receptores de adenosina.*

Es bien sabido que la ocupación de un receptor de adenosina es seguida de una alteración de los niveles de AMPc de un tejido, y como se ha descrito anteriormente, la primera clasificación de los purinoreceptores  $P_1$  se basó en esta propiedad de la adenosina. Estos estudios demuestran que la activación de los receptores  $A_1$  de adenosina resulta en una inhibición de la actividad adenilato ciclasa, mientras que la activación del subtipo  $A_2$  implica una activación de la misma enzima. El efecto que los receptores de adenosina tienen sobre la actividad de la adenilato ciclasa al ser activados, es mediado vía proteínas con capacidad de unión de nucleótidos de guanina (proteínas G). La interacción de los receptores de adenosina con las proteínas G se puso de manifiesto por diferentes técnicas. En efecto, los receptores  $A_1$  se han copurificado en asociación con proteínas G (Munshi and Linden, 1989); además, se ha observado que el receptor  $A_1$  soluble presenta la capacidad de ser regulado por proteínas G (Gavish et al., 1982; Stiles, 1985; Casadó et al., 1990).

El receptor  $A_1$  de adenosina está acoplado a proteínas  $G_{i1}$ ,  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$  y  $G_o$  (Freissmuth et al., 1991; Munshi et al., 1991). En concordancia, se observa que la toxina pertusis bloquea casi todas las respuestas inducidas vía activación de los receptores  $A_1$ . La estimulación de estos receptores afecta a diversos sistemas efectores: inhibe la adenilato ciclasa (Van Calker et al., 1978; Londos et al., 1980), inhibe la conductancia de  $Ca^{2+}$  (Dolphin et al., 1986; Scholz and Miller, 1991; Mogul et al., 1993), estimula la conductancia de  $K^+$  (Bellardinelli and Isenberg 1983; Trussell and Jackson, 1985; Böhm et al., 1986) y activa la fosfolipasa C (Gerwins and Fredholm, 1992). El receptor  $A_2$  de adenosina activa la adenilato ciclasa a través de una proteína  $G_s$ . Por otro lado, se ha observado que el receptor  $A_2$  potencia los canales de  $Ca^{2+}$  de tipo P en neuronas del hipocampo a través de un mecanismo que implica la participación de proteína quinasas dependientes de AMPc (Mogul et al., 1993). Se desconoce si otras proteínas G o efectores están regulados por el receptor  $A_2$ . La transmisión de la señal a través del receptor  $A_3$  de adenosina permanece aún por dilucidar. Lo que sí se ha demostrado es que la estimulación de este receptor inhibe la acumulación de AMPc, lo cual hace sospechar que será el subtipo  $G_i$  de proteína G el principal candidato a estar acoplado al receptor  $A_3$  (Meyerhof et al., 1991; Zhou et al., 1992). Finalmente, del receptor  $A_4$  se sabe que no está acoplado a proteínas G, desconociéndose totalmente el mecanismo a través del cual estimula la conductancia de  $K^+$ .

#### *A.4.4. Transmisión de la señal a través de los receptores acoplados a las proteínas G.*

Las señales extracelulares (hormonas/neurotransmisores y moduladores) ejercen sus funciones por unión específica a receptores de la célula diana. Estos receptores se clasifican en cinco tipos: canales iónicos intrínsecos, receptores acoplados a proteínas G, moléculas de adhesión celular, receptores para factores de crecimiento, y receptores intracelulares (como los de las hormonas esteroides). La activación de un receptor puede conllevar una gran variedad de

eventos celulares tales como cambios en el potencial de membrana, producción de segundos mensajeros o la transcripción/traducción de genes que finalmente implicarán una respuesta fisiológica.

<u>Receptores de Péptidos</u>	<u>Neurotransmisores</u>
Angiotensina.	Adenosina.
Adrenocorticotropina.	Adrenérgicos:
Bombesina.	$\alpha$ -adrenérgico.
Colecistoquinina.	$\beta$ -adrenérgico
Coriogonadotropina.	Dopamina..
Hormona liberadora de corticotropina.	GABA.
Hormona estimulante de los foliculos.	Histamina.
Glucagón	Muscarínico (acetilcolina).
Hormona liberadora de gonadotrfina.	Octopamina.
Hormona liberadora de hormona de crecimiento	5-HT (serotonina).
Quininas:	
Bradiquinina.	<u>Sensoriales</u>
Sustancia P.	Visión (rodopsinas).
Sustancia K	Olfativos.
Hormona leutinizante.	Gusto.
Hormona estimulante de los melanocitos	
Neurotensina.	
Opiáceos.	<u>Otros</u>
Oxitocina.	Cannabioides.
Hormona paratiroidea.	IgE
Somatostatina.	Oncogén <i>Mas.</i>
Tirotropina.	fMet-Leu-Phe.
Hormona liberadora de tirotropina.	Factor activador de plaquetas.
Peptido vasoactivo intestinal.	Prostanoides:
Vasopresina.	Prostaglandinas.
	Leucotrienos.
	Trombina.

**Tabla VI.** La superfamilia de receptores acoplados a proteína G

El número de factores endógenos que se unen a receptores acoplados a proteínas G es bastante importante, pero aún es mayor el número de receptores que median en su acción. Entre los receptores de neurotransmisores existen al menos diez receptores adrenérgicos ( $\alpha_{1A}$ - $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{2A}$ - $\alpha_{2D}$  y  $\beta_1$ - $\beta_3$ ), al menos cinco muscarínicos de acetilcolina (m1-m5), cinco para la dopamina ( $D_1$ - $D_5$ ) y al menos cuatro para la adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  y  $A_3$ ), entre otros. Una relación de esta superfamilia de receptores se muestra en la Tabla VI. Los receptores acoplados a proteínas G comprenden una familia de receptores que poseen características en común (Ross, 1989). Estos receptores están compuestos por una única cadena polipeptídica que atraviesa la membrana plasmática siete veces, poseyendo por lo tanto siete dominios transmembrana con estructura  $\alpha$ -

hélice. La parte aminoterminal está localizada en la cara exterior de la membrana plasmática y puede presentar diferentes grados de glicosilación. Las hélices  $\alpha$  de los dominios transmembrana interactúan entre sí constituyendo una zona en el interior de la membrana que es importante para la unión del ligando al receptor.

Un estudio más detallado de las diferentes secuencias revela que existen ciertos aminoácidos o dominios conservados. Como ejemplos, cabe mencionar dos cisteínas extracelulares que forman un puente disulfuro, prolinas en los dominios IV, V, VI y VII, una asparagina en el dominio I, una leucina en el II y una arginina en el III. Los aminoácidos polares conservados en los dominios transmembrana quedan localizados en el interior de la zona de interacción de las hélices, mientras que los apolares lo hacen en el exterior. Se puede especular que los aminoácidos estrictamente conservados juegan un papel esencial en el mantenimiento de la estructura, mientras que los que varían entre subfamilias definirían las propiedades funcionales de las mismas (Atwood et al., 1991).

La cadena polipeptídica forma tres "loops" intracelularmente que son importantes para acoplar el receptor a las proteínas G. La proteína G puede activar a su vez diferentes sistemas efectores intracelulares, como las enzimas adenilato ciclasa y la fosfolipasa C, o canales iónicos. La activación de estos efectores origina cambios importantes en el medio intracelular, como pueden ser la fosforilación de proteínas o incrementos en la concentración de calcio.

#### *A.4.4.1. Proteínas heterotriméricas que unen GTP.*

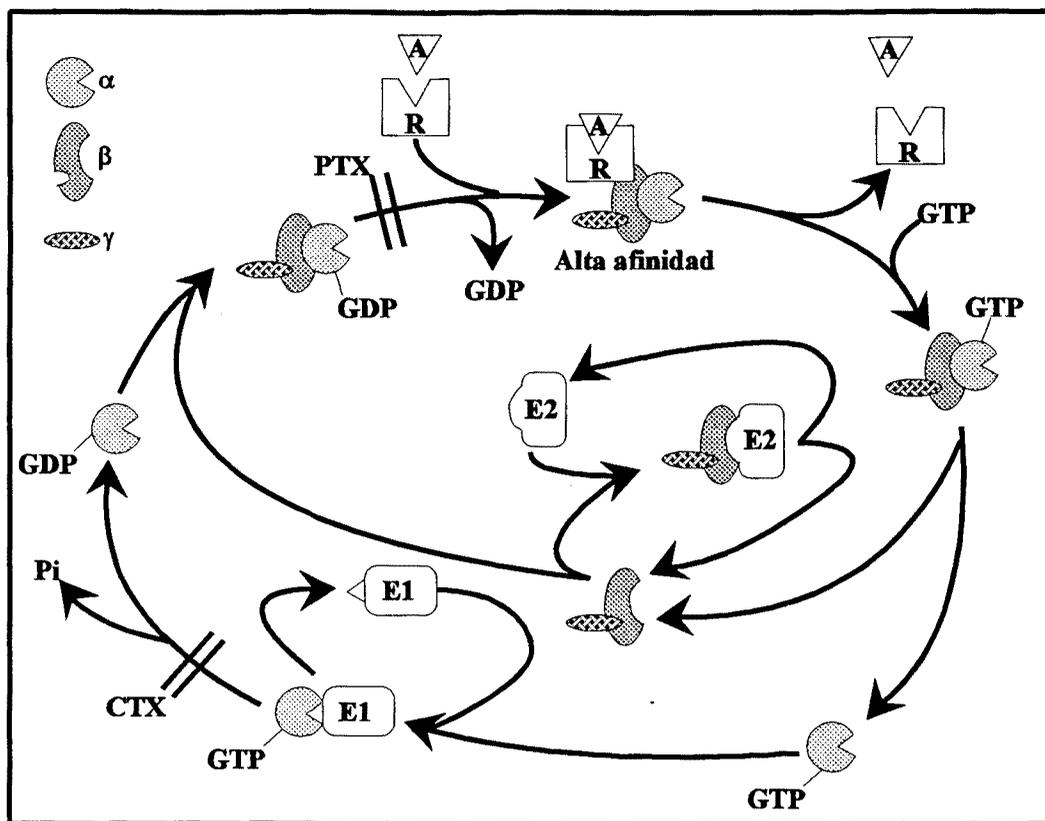
Las proteínas heterotriméricas que unen nucleótidos de guanina, las proteínas G, son transductores de señales generadas extracelularmente, acoplando receptores específicos a sistemas efectores intracelulares (Casey and Gilman, 1988; Ross, 1989; Birnbaumer, 1990; Birnbaumer et al., 1990; Bockaert, 1991; Olate and Allende, 1991; Simon et al., 1991; Spiegel, 1991; Spiegel et al., 1992). En 1970 se propuso la existencia de un elemento regulador (transductor) entre determinados receptores y sus efectores (Birnbaumer et al., 1970). Estos elementos han sido ya caracterizados en detalle, apareciendo como una superfamilia de proteínas que incluye desde proteínas involucradas en la síntesis proteica (factores de iniciación y elongación) hasta proteínas de bajo peso molecular que unen GTP, tales como las Ras (Bourne et al., 1990; Kaziro et al., 1991). Todos los miembros de esta superfamilia presentan una alta afinidad para la unión de GTP, lo cual implica la activación de estas proteínas a través de un cambio conformacional. Por otro lado, estas proteínas poseen una actividad GTPasa intrínseca que conlleva una inactivación reversible de la proteína.

Las proteínas G difieren de los otros miembros de la superfamilia en que son heterotriméricas, compuestas por tres subunidades:  $\alpha$  (de 39-45 kDa),  $\beta$  (de 37 kDa) y  $\gamma$  (de 8 kDa). Se han identificado más de 21 subunidades  $\alpha$ , distribuidas en cuatro subfamilias ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_q$  y  $\alpha_{12}$ ) (Tabla VII), y al menos cuatro subunidades  $\beta$  y seis subunidades  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  es la que se utiliza para distinguir los diferentes oligómeros. Las subunidades  $\beta/\gamma$  están fuertemente asociadas y funcionan como una sola unidad. Las proteínas G están localizadas en la cara interna de la membrana plasmática sin ser proteínas de transmembrana. El modelo de activación de las proteínas G (Freissmuth et al., 1989; Ross, 1989; Birnbaumer, 1990; Bourne et al., 1990, 1991; Conklin and Bourne 1993) se muestra esquemáticamente en la figura 8. El receptor y la proteína G están disociados cuando el primero se encuentra en un estado de reposo y presenta baja afinidad por los agonistas. En este punto, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G tiene débilmente unida una molécula de GDP y posee alta afinidad por las subunidades  $\beta/\gamma$ . La unión de un agonista al receptor promueve la asociación del receptor con la proteína G en su estado de unión de GDP.

Esta interacción entre el receptor y la proteína G implica la liberación de la molécula de GDP, y en este punto, con el centro de unión de nucleósidos de guanina libre, el receptor muestra su estado de alta afinidad siendo ésta una conformación estable en ausencia de GTP. Cuando una molécula de GTP se une a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, ésta sufre un cambio conformacional que origina una disociación del receptor del complejo de proteína G y una disociación de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha$ -GTP) de las subunidades  $\beta/\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  con el GTP unido es capaz de activar diferentes sistemas efectores dependiendo del tipo de subunidad  $\alpha$  implicada. Sin embargo, esta activación es rápidamente neutralizada por la actividad GTP-asa intrínseca de la propia subunidad  $\alpha$ . Se ha observado que la unión de determinadas subunidades  $\alpha$  a la fosfolipasa C incrementa la hidrólisis del GTP (Berstein et al., 1992). Este mecanismo es análogo al de la transmisión de señal vía  $p21^{ras}$  en que son activadas proteínas específicas con actividad GTP-asa (GAPs) y se produce un incremento de la hidrólisis de GTP (Bollag and McCormick, 1991). La subunidad  $\alpha$  unida a GDP se reasocia con las subunidades  $\beta/\gamma$  y vuelve a estar disponible para responder a la unión del agonista a su receptor (Figura 8). Se ha sugerido que una difosfoquinasa podría estar localizada próxima a la proteína G y que sería responsable del mantenimiento de altas concentraciones de GTP en el entorno más inmediato de la proteína G (Kikkawa et al., 1990). Sin embargo, la concentración de GTP en la célula está próxima a 1 mM, por lo tanto, la necesidad de un sistema generados de GTP no es nada válida.

Existen 16 genes diferentes que codifican para la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, y debido a las diferentes alternativas de "splicing" se conocen más de 20 subunidades distintas. Las subunidades  $\alpha$  poseen entre 350 y 395 aminoácidos y muestran entre un 40% y un 80% de homología en su estructura primaria (Gilman 1987; Lochrie and Simon 1988; Olate and Allende, 1991; Simon et al., 1991). La parte aminoterminal está involucrada en la unión con las subunidades  $\beta/\gamma$ , mientras que la carboxiterminal es fundamental para la interacción receptor-proteína G (Conklin and Bourne, 1993). La toxina de la tosferina o toxina pertussis (PTX), aislada de *Bordetella Pertussis*, ADP-ribosila un residuo de cisteína próximo al extremo C-terminal de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas  $G_i$  y  $G_o$ . La modificación por la toxina pertussis impide la activación de la proteína G mediada por el receptor, ya que desacopla irreversiblemente el receptor de su sistema efector (Hepler and Gilman, 1992), constituyendo una herramienta valiosísima en la identificación de los tipos  $G_i$  y  $G_o$  de proteínas G (Gierschik, 1992).

Recientemente, se ha demostrado que el extremo carboxiterminal de los receptores es el que determina la especificidad de efector (Conklin et al., 1993). El dominio responsable de la actividad GTPasa de la proteína G se encuentra localizado en la zona media de la proteína, pues mutaciones en este área eliminan totalmente la actividad GTPasa (Landis et al., 1989). La toxina del cólera (CTX), aislada de *Vibrio Cholerae*, cataliza la ADP ribosilación, empleando  $NAD^+$  como sustrato, de un residuo de arginina del centro enzimático de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas  $G_s$ . La modificación de la subunidad  $\alpha$  por la toxina del cólera activa constitutivamente la proteína G por inhibición de su actividad GTPasa (Yamane and Fung, 1993). Efectos similares a los de la toxina del cólera pueden obtenerse por efecto del tetrafluoruro de aluminio en combinación con iones  $Mg^{2+}$ ; ambos parecen interaccionar con la subunidad  $\alpha$  imitando el efecto de la entrada del GTP. De la misma manera, análogos no hidrolizables del GTP, como el Gpp(NH)p, mantienen también indefinidamente la proteína G en estado activado (Sternweis and Gilman, 1982).



**Figura 8.** Ciclo GTPasa de la proteína G. Ver el texto para más detalle. Abreviaturas: E1, efector para la subunidad  $\alpha$  (adenilato ciclasa,...); E2, efector para las subunidades  $\beta/\gamma$  (fosfolipasa  $C_\beta$ ); CTX, toxina del cólera; PTX, toxina pertussis; A, agonista; R, receptor; Alta afinidad, estado de alta afinidad del receptor para el agonista.

Se sabe mucho menos acerca de la estructura y función de las subunidades  $\beta/\gamma$ . Poseen respectivamente 340 y 70 aminoácidos de longitud, y existen al menos 4 genes para la subunidad  $\beta$  y 5 para la subunidad  $\gamma$  (Fong et al., 1986; Gautam et al., 1989; Birnbaumer et al., 1990). Durante mucho tiempo se ha pensado que la función de las subunidades  $\beta/\gamma$  era la de reciclar las subunidades  $\alpha$  para renovar la activación de las proteínas G, quedando demostrado que las subunidades  $\alpha$  son incapaces de activar a sus efectores si no es en la presencia de las subunidades  $\beta/\gamma$  (Tang and Gilman, 1991; Federmann et al., 1992). Sin embargo, a las subunidades  $\beta/\gamma$  se las ha hecho responsables de la inhibición de la adenilato ciclasa vía receptores acoplados a proteína  $G_i$  por unión e inactivación de subunidades  $\alpha_s$  activas (Gilman 1984). Por otro lado, se ha demostrado que las subunidades  $\beta/\gamma$  activan directamente la fosfolipasa  $A_2$  (Jelsema and Axelrod, 1987; Axelrod et al., 1988) y regulan canales de potasio (Logothetis et al., 1987; Kim et al., 1989; Okabe, 1990). Recientemente, se ha demostrado que las subunidades  $\beta/\gamma$  regulan la actividad de la adenilato ciclasa (Tang and Gilman, 1991; Federman et al., 1992; Taussig et al., 1993a) y de la fosfolipasa C (Blank et al., 1992; Carozzi et al., 1993; Wu et al., 1993).

#### A.4.4.2. Modificación, combinación y función de las subunidades $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ .

Las proteínas G no presentan dominios que puedan asociarse obviamente a una bicapa lipídica, pero el heterotrímero está unido a la membrana plasmática. Este anclaje está facilitado por los lípidos covalentemente unidos que presenta la proteína, concretamente, la subunidad  $\alpha$  está miristoilada en su glicina terminal ( $\alpha_o$ ,  $\alpha_i$  y  $\alpha_z$ ) y palmitoilada ( $\alpha_s$ ,  $\alpha_o$ ,  $\alpha_{i1-3}$ ,  $\alpha_z$  y  $\alpha_q$ ) en un punto aún no identificado de su secuencia. A su vez, la subunidad  $\gamma$  presenta una cisteína prenilada por radicales geranilgeranil o farnesil (Casey, 1994). Estas modificaciones sólo facilitan la asociación de las subunidades  $\beta/\gamma$  con la membrana plasmática, con la subunidad  $\alpha$  y con los efectores (Mumby et al., 1990; Linder et al., 1993), y puede ser importante en la determinación de la especificidad de las interacciones proteína G-receptor. Recientemente se ha demostrado que la subunidad  $\alpha_i$  ha de estar miristoilada para ser capaz de inhibir la adenilato ciclasa (Taussig et al., 1993 b).

Teniendo en cuenta el número de diferentes subunidades identificadas hasta el momento y el hecho de que diferentes subunidades  $\alpha$  pueden combinarse con casi todos los complejos  $\beta/\gamma$ , se puede obtener cerca de un millar de combinaciones de heterotrímeros. Si a esto le sumamos el elevado número de receptores que podemos acoplar y las diferentes enzimas o canales responsables de la respuesta bioquímica primaria que pueden ser regulados, tanto por la subunidad  $\alpha$ , como por el complejo  $\beta/\gamma$ , tenemos el panorama extremadamente complicado en el control de la función celular por los estímulos externos (Sternweis, 1994). En la Tabla VII se presenta un resumen. Aparte de esta promiscuidad en la posible combinación de las diferentes subunidades en sistemas reconstituidos, parece observarse una cierta selectividad *in vivo* en el sentido que una subunidad  $\alpha$  determinada transduce una señal más eficazmente cuando está complejada con subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  específicas (Kleuss et al, 1992, 1993; Wu et al., 1993). No todas las células expresan las diferentes subunidades  $\alpha$ ; al parecer, algunas formas de las subunidades  $\alpha_s$ ,  $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i1}$  se encontrarían como proteínas constitutivas ("housekeeping"), pues parece ser que se expresan en todas las células. Por otro lado, muchas células también expresan  $\alpha_q$  y  $\alpha_{i1}$  o  $\alpha_{i3}$ , y alguna de las dos  $\alpha_{i2}$  o  $\alpha_{i3}$  (Birnbaumer 1993). Sin embargo, se ha observado que  $\alpha_i$ ,  $\alpha_{of}$  y  $\alpha_{gust}$  se expresan exclusivamente en retina, epitelio olfativo y epitelio gustativo respectivamente; recientemente se ha encontrado  $\alpha_{of}$  en ganglio basal (Drinnan et al, 1991). Las subunidades restantes ( $\alpha_o$ ,  $\alpha_{i4}$ ,  $\alpha_{i5}$ ,  $\alpha_z$ ), no se expresan exclusivamente en un tipo celular determinado, pero tampoco son ubíquas. La distribución de las diferentes subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  no está bien caracterizada, lo único que se sabe es que cada célula expresa 2 o 3 subtipos de cada. Integrando todos estos resultados, se podría extrapolar que si una célula media expresa 10 subunidades  $\alpha$  diferentes y si estas subunidades  $\alpha$  son capaces de combinarse libremente con las diferentes subunidades  $\beta/\gamma$ , esto ofrecería entre 40 y 90 diferentes proteínas G por célula que serían capaces de acoplar a los distintos receptores con los diferentes sistemas efectores (Birnbaumer, 1993).

La nomenclatura de las proteínas G se basa en el tipo de subunidad  $\alpha$  que está involucrada (Tabla VII). La adenilato ciclasa es estimulada por  $G_s$  y por  $G_{of}$  e inhibida por  $G_i$  y  $G_o$ . La fosfolipasa C es activada por  $G_q$  y  $G_{i1}$ , y la GMPc fosfodiesterasa, específica en retina, es inhibida por  $G_i$ . La especificidad receptor/proteína G no es absoluta y tampoco es completamente promiscua: diferentes tipos de receptores pueden activar  $G_s$ , y receptores para la misma hormona pueden activar diferentes proteínas G. Por otro lado, una única proteína G puede activar diferentes efectores ( $\alpha_s$  regula la adenilato ciclasa y canales de calcio) o diferentes

proteínas G poseen el mismo efector ( $G_{1,3}$  inhiben canales de potasio).

Familia	MW Subunidad (kDa)	Toxina	Distribución Tisular	Efector	Mensajero Intracelular
$G_s$					
$\alpha_{s(S)}$	44.2	CTX	Ubícuca	$\uparrow$ adenilato ciclasa	$\uparrow$ AMPc
$\alpha_{s(L)}$	45.7	CTX	Ubícuca	$\uparrow$ canales $Ca^{2+}$ $\downarrow$ canales $Na^+$	$\uparrow$ $Ca^{2+}$ $\downarrow$ $Na^+$
$\alpha_{olf}$	44.7	CTX	Epitelio olf.	$\uparrow$ adenilato ciclasa	$\uparrow$ AMPc
$G_i$					
$\alpha_{i1}$	40.3	PTX	Ubícuca	$\uparrow$ canales $K^+$	$\uparrow$ $K^+$
$\alpha_{i2}$	40.5	PTX	Ubícuca	$\downarrow$ canales $Ca^{2+}$	$\downarrow$ $Ca^{2+}$
$\alpha_{i3}$	40.5	PTX	Ubícuca	$\downarrow$ adenilato ciclasa (?)	$\downarrow$ AMPc
$\alpha_{i0A}$	40.0	PTX	Cerebro	$\uparrow$ fosfolipasa C (?)	$\uparrow$ $IP_3/Ca^{2+}$
$\alpha_{i0B}$	40.1	PTX	Cerebro	$\uparrow$ fosfolipasa A2 (?)	
$\alpha_{i1}$	40.0	CTX/PTX	Bastones	$\uparrow$ fosfodiesterasa	$\downarrow$ GMPc
$\alpha_{i2}$	40.1	CTX/PTX	Conos	del cGMP	
$\alpha_{gust}$	40.5	CTX(?) /PTX	Epitelio gust	?	?
$\alpha_z$	40.9	?	Cerebro	$\downarrow$ adenilato ciclasa (?)	$\downarrow$ AMPc otros (?)
$G_q$					
$\alpha_q$	42	no	Ubícuca	$\uparrow$ fosfolipasa C	$\uparrow$ $IP_3/Ca^{2+}$
$\alpha_{11}$	42	no	Ubícuca	otros (?)	
$\alpha_{14}$	41.5	no	Pulmón, riñón Hígado.	?	?
$\alpha_{15}$	43	no	Células B Células mieloides	?	?
$\alpha_{16}$	43.5	no	Células T Células mieloides	$\uparrow$ fosfolipasa C	$\uparrow$ $IP_3/Ca^{2+}$
$G_{12}/G_{13}$					
$\alpha_{12}$	44	?	Ubícuca	?	?
$\alpha_{13}$	44	?	Ubícuca	?	?

Tabla VII. Clasificación de las diferentes subunidades  $\alpha$  de las proteínas G y sus sistemas efectores acoplados.

#### A.4.5. Regulación de los receptores acoplados a proteínas G.

La propiedad más impresionante de todas las células es la capacidad de comunicación entre ellas a través de una gran variedad de señales y de receptores. Células tan diferentes como las hematopoiéticas, gliales y neuronales son capaces de intercambiar información vía citoquinas, factores de crecimiento, neuropéptidos y neurotransmisores clásicos. Prácticamente todas las células poseen receptores en su membrana plasmática y en su núcleo. Los receptores de membranas resultan ser más complejos, pues han de convertir una señal del exterior en otra correspondiente en el interior sin que el transmisor químico o ligando atraviese la membrana. Esta incapacidad de atravesar la membrana tiene una gran ventaja pues proporciona una gran selectividad y estrecha conexión en el diálogo entre células. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que determinados sistemas de regulación ("feedback") parecen controlar la transmisión de la señal en la célula. El efecto de una hormona sobre su receptor puede ser regulado a muchos niveles (segundos mensajeros,...), pero lo es sobre todo a nivel del propio receptor. Muchos de esos sistemas de regulación intracelulares se activan por la propia activación de receptores específicos, implicando un ciclo de autorregulación iniciado por el propio receptor y que conlleva una disminución de la señal iniciada por la activación de este receptor. Por lo tanto, este mecanismo originará una reducción de la respuesta a un determinado estímulo que se presenta de forma repetida, un fenómeno que es denominado desensibilización.

El proceso de desensibilización puede subdividirse en diferentes tipos en función del fenómeno observado: según el estímulo que origina la desensibilización, se habla de desensibilización heteróloga o generalizada con respecto a la desensibilización homóloga o específica del propio receptor; según el tiempo de acción, se habla de desensibilización rápida cuando ésta ocurre en minutos, y desensibilización lenta cuando va de horas a días; y finalmente, dependiendo del tipo de mecanismo que actúa se diferencia entre la desensibilización que implica una pérdida de la capacidad de transmitir la señal (a menudo denominada desacoplamiento del receptor), con respecto a la que implica una pérdida del número de receptores ("down-regulation"). Evidentemente, estas subdivisiones son complementarias. Por ejemplo, un mecanismo específico de regulación como es la desensibilización de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mediada por la quinasa específica de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARK), es rápida, homóloga y origina una pérdida de la función del receptor o capacidad de transmitir la señal. Sin embargo, el efecto que el AMPc ejerce sobre el receptor de TRH es lento, heterólogo y afecta al número de receptores ("down-regulation").

La desensibilización es un proceso que se observa como respuesta a una amplia variedad de estímulos y que se puede encontrar en multitud de organismos. Por ejemplo, la desensibilización de los receptores acoplados a proteínas G, aparentemente mediada por mecanismos muy similares, puede observarse en las levaduras en respuesta a factores del medio; en el hongo *Dictyostelium* tras la estimulación con AMPc; en la retina en respuesta a la luz; en el sistema olfatorio en respuesta a un estímulo odorante y en multitud de sistemas hormonales y de neurotransmisores. La desensibilización puede tener dos funciones principales: puede servir para finalizar una respuesta a un estímulo individual, u originar una reducción general en la capacidad de respuesta sin dejar de responder a un estímulo individual. Posiblemente, ambos efectos pueden ocurrir a través del mismo mecanismo. En cualquier caso, el efecto final de la desensibilización es el de reducir el efecto estimulador para mantener la capacidad de respuesta. En este sentido, es interesante observar que la desensibilización parece ser más pronunciada para sistemas de receptores estimuladores que para receptores inhibitorios.

#### *A.4.5.1. Desensibilización de la capacidad de transmisión de señal.*

La desensibilización de la función o capacidad de transmisión de la señal está basada en desacoplar al receptor de su sistema de transducción de señal, y está mediada por un proceso de fosforilación del receptor que es un paso crítico en este mecanismo. Esta fosforilación puede estar mediada por quinasas específicas del receptor, como es el caso de las quinasas que fosforilan a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARK) (Benovic et al., 1984, 1991), o mediada por quinasas efectoras tales como la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC).

Las quinasas específicas de receptor, como la  $\beta$ ARK, fosforilan tan sólo receptores activos, es decir, receptores que están ocupados por su agonista. Al parecer, existen dos mecanismos esenciales para mantener esta estricta dependencia del agonista: (a) la quinasa, que se encuentra de manera normal en el citosol, necesita unirse a las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína G (que presumiblemente se encuentran disociadas de la subunidad  $\alpha$  tras la activación de la proteína G por el receptor) para poder establecer contacto con la membrana plasmática y posicionarse para la fosforilación del receptor (Haga and Haga, 1990, 1992; Pitcher et al., 1992); y (b) sólo el receptor ocupado por el agonista (receptor activo), y por lo tanto, con una conformación estructural determinada, es sustrato para la quinasa (Benovic et al., 1986). En el caso del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, la capacidad de los receptores para activar su proteína  $G_s$  no se ve alterado por la fosforilación por  $\beta$ ARK. Sin embargo, esta fosforilación aumenta la afinidad del receptor para la proteína inhibidora  $\beta$ -arrestina (Lohse et al., 1990). La unión de la  $\beta$ -arrestina al receptor inhibe la interacción de éste con la proteína  $G_s$ , generando el estado desacoplado o desensibilizado del receptor (Lohse et al., 1992). Muchos otros sistemas de receptores acoplados a proteínas G parecen estar regulados por quinasas específicas las cuales podrían ser idénticas u homólogas a la  $\beta$ ARK, y presentan una desensibilización del receptor específica (desensibilización homóloga). Dentro de la familia de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se ha descrito esta desensibilización homóloga en los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , y de manera menos marcada (Nantel et al., 1993) o prácticamente nula (Liggett et al., 1993) en el subtipo  $\beta_3$ . Otros ejemplos de desensibilización homóloga observada en sistemas celulares aislados incluyen receptores acoplados a proteína  $G_s$  tales como el receptor de dopamina  $D_1$  (Balmfort et al., 1990), el receptor de vasopresina  $V_2$  (Birnbaumer et al., 1992), el receptor de serotonina 5-HT<sub>4</sub> (Ansanay et al., 1992) y el receptor de adenosina  $A_{2a}$  (Palmer et al., 1994). Un patrón similar de desensibilización homóloga se ha encontrado para receptores que activan la fosfolipasa C, tales como el receptor de serotonina 5-HT<sub>2</sub> (Ivins and Molinoff, 1991), el receptor de histamina  $H_1$  (Smit et al., 1992) y el receptor de angiotensina II (Abdellatif et al., 1991). La situación es menos clara para los receptores acoplados a la proteína  $G_i$ , pues en muchos de estos receptores parece existir un patrón de desensibilización homóloga rápida, aunque en muchos casos en menor grado con respecto a los receptores acoplados a proteínas  $G_s$ . Esta desensibilización rápida se ha observado en el receptor de dopamina  $D_2$  (Bates et al., 1991), pero no en el receptor muscarínico colinérgico m1 (Richardson and Hosey, 1992) ni en el receptor de serotonina 5-HT<sub>1B</sub> (Pleus and Bylund, 1992).

Muchos receptores acoplados a proteínas G, aparte de poder ser fosforilados por sus quinasas específicas, son susceptibles de ser fosforilados por quinasas efectoras como la proteína quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC). Este tipo de fosforilación ofrece una regulación directa negativa del receptor ("feedback" negativo), pues la enzima efectora (PKA, PKC) inhibe su propia estimulación. Al mismo tiempo, esta fosforilación permitiría una forma de desensibilización generalizada y no específica del receptor, la cual se denomina desensibilización

heteróloga. Se denomina así debido a que cualquier vía de activación de estas quinasas, independiente de la ocupación del receptor por su agonista, es suficiente para fosforilar al receptor (Benovic et al., 1985). La fosforilación por quinasas efectoras (PKA y PKC) es más lenta que la mediada por las quinasas específicas de receptor (Roth et al., 1991), resulta ser más generalizada (heteróloga) y mucho más sensible a la concentración de agonista (Lohse et al., 1990), debido a la amplificación que sufre la señal desde el receptor ocupado por el agonista (mediada por las proteínas G) hasta llegar a la enzima efectora (PKA y PKC). Como consecuencia, se ha especulado que estas proteínas quinasas efectoras podrían mediar la desensibilización de receptores en respuesta a bajas concentraciones de agonista, mientras las quinasas específicas de receptor mediarían la desensibilización a altas concentraciones de agonista. El grado en el que ambos mecanismos se encuentran operando en una célula individual y en un receptor único depende de multitud de factores: del número de centros de fosforilación para las diferentes quinasas en un receptor individual, de los niveles celulares de las diferentes quinasas y de las proteínas implicadas en la desensibilización ( $\beta$ -arrestina,...), y del grado de estimulación del receptor.

Los cuatro subtipos de receptores de adenosina clonados presentan alguna secuencia consenso de fosforilación por alguna de la quinasas mencionadas. Además, el receptor  $A_{2a}$ , como muchos otros acoplados positivamente a la adenilato ciclasa, presenta secuencias ricas en serinas y treoninas, posibles sustratos de una quinasa similar a la  $\beta$ ARK. Experimentalmente se ha demostrado que la incubación de células DDT<sub>1</sub>MF-2 con el agonista R-PIA provoca la desensibilización del receptor  $A_1$ , paralelamente a la incorporación de [<sup>32</sup>P] ortofosfato en la banda de 36 kDa correspondiente a este receptor (Ramkumar et al., 1991). En estas mismas células el subtipo  $A_{2a}$  no parece regularse por fosforilación (Ramkumar et al., 1991); sin embargo, estudios posteriores en células CHO que expresan este subtipo, han demostrado también una relación directa entre desensibilización y fosforilación (Palmer et al., 1994).

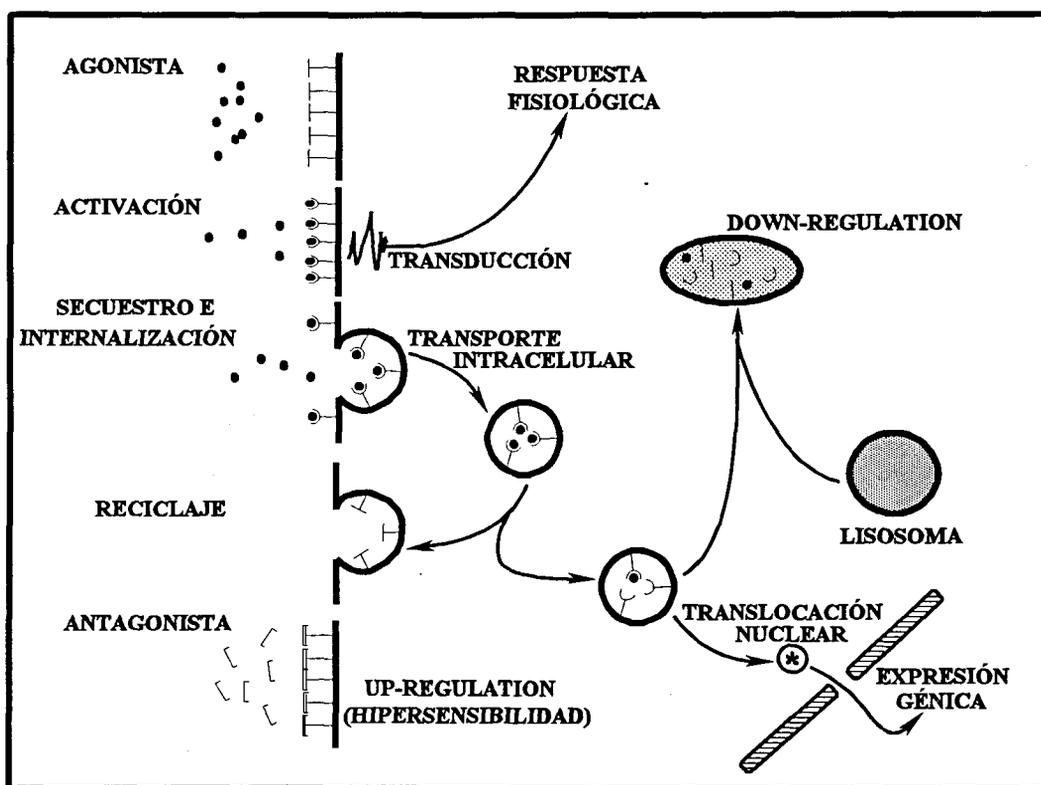
#### *A.4.5.2. Secuestro de los receptores acoplados a proteína G.*

Aparte del desacoplamiento funcional de los receptores (desacoplamiento de la proteína G), los receptores pueden sufrir una pérdida rápida de la función fisiológica a la que están acoplados y que es debida a la translocación de los receptores a lugares intracelulares en los cuales no pueden interaccionar con sus ligandos ni con las proteínas G (Harden, 1983). La localización exacta de los receptores secuestrados no está demasiado clara, desarrollándose por tanto varias hipótesis. La hipótesis más clásica de que los receptores secuestrados se encuentran en endosomas intracelulares (Perkins et al., 1991) se basa en las siguientes observaciones: (a) los receptores secuestrados son inaccesibles a ligandos hidrofílicos, pero siguen siendo accesibles a los ligandos hidrofóbicos (Stahelin and Simons, 1982); (b) los receptores secuestrados se encuentran en una fracción de membrana que tiene menor densidad que la membrana plasmática (Harden et al., 1980); y (c) los agentes que interfieren en la internalización vía vesículas recubiertas de clatrina también evitan el secuestro de los receptores (Hertel et al., 1986).

Muchos aspectos de las señales que desencadenan el secuestro de los receptores son aún desconocidos. El secuestro es iniciado por la entrada del agonista en el centro activo del receptor, pero no parece que se requiera el acoplamiento a la proteína G o la fosforilación por quinasas efectoras (PKA,..) o por quinasas dependientes de ligando (Lohse et al., 1990; Strader et al., 1987; Hausdorff et al., 1989; Mahan et al., 1985; Campbell et al., 1991). Recientemente, se ha demostrado que una secuencia rica en serinas y/o treonina de los receptores muscarínicos

colinérgicos m1, m2 y m3 juega un papel crítico en el secuestro de estos receptores (Moro et al., 1993).

Inicialmente, se pensó que el secuestro de los receptores era puramente un mecanismo de desensibilización, pues en la fracción de vesículas donde se encontraba el receptor, no se observaba la presencia de proteínas G, por lo tanto, no podía acontecer el acoplamiento entre ambas proteínas (Waldo et al., 1983). Sin embargo, distintas observaciones argumentaban a favor de asignar al proceso de secuestro alguna otra función: en primer lugar, en muchos sistemas, el secuestro de receptores es lento en comparación con la desensibilización por fosforilación (Roth et al., 1991) y en segundo lugar, en muchos sistemas celulares la cantidad de receptores secuestrados es muy pequeña para ser la responsable de un efecto claro de desensibilización (Lohse et al., 1990). Una hipótesis alternativa es que el secuestro de receptores constituya un mecanismo de resensibilización, el cual permita la desfosforilación de los receptores que han sido fosforilados en la membrana plasmática (Sibley et al., 1986).



**Figura 9.** Modelo de regulación de los receptores acoplados a proteína G. El agonista induce secuestro e internalización de los receptores, los cuales pueden volver de nuevo a la membrana (reciclaje), o degradarse en lisosomas (down-regulation), o inducir la translocación nuclear de terceros mensajeros para modular la expresión génica. El antagonista origina una hipersensibilización o up-regulation de los receptores

El secuestro de los receptores inducido por el agonista es rápido, se bloquea por antagonista y es dependiente de la temperatura y de la concentración de agonista (Maloteaux and Hermans, 1994). Por otro lado, el antagonista induce un aumento del número de receptores en la superficie celular (Figura 9) en un proceso denominado hipersensibilización o up-regulation.

#### *A.4.5.3. Down-regulation de los receptores acoplados a proteína G.*

Aparte de los mecanismos que regulan la función de los receptores acoplados a proteína G, existen otros mecanismos que conllevan a una desensibilización de los receptores vía un decremento del número de los mismos. Esta reducción en el número de receptores se denomina genéricamente como "down-regulation". La down-regulation de un receptor es un proceso lento comparado con las alteraciones de la función del receptor descritas anteriormente. Normalmente, acontece a lo largo de horas, sin llegar nunca al máximo antes de 24 h de continua exposición al agonista. Es un proceso que puede estar afectado por dos tipos de mecanismos: aumento de la degradación de los receptores, o disminución de la síntesis de los mismos. El reciclaje ("turnover") basal de los receptores acoplados a proteínas G es generalmente bajo (la vida media se encuentra entorno a varios días), por lo tanto, el efecto en la disminución de la síntesis de receptores no afectará hasta transcurridas 24 h.

La degradación del receptor puede ser iniciada por dos mecanismos bien diferenciados; en uno el propio agonista sería el que originaría la internalización (desensibilización homóloga); en el otro el fenómeno sería iniciado por una quinasa efectora (PKA,...), resultando ser una desensibilización heteróloga. La down-regulation dependiente de agonista requiere que el receptor permanezca acoplado a su proteína G (Mahan et al., 1985; Campbell et al., 1991; Hadcock et al., 1989a). La fosforilación por quinasas efectoras incrementa la degradación de los receptores (Bouvier et al., 1989), mientras que la fosforilación por quinasas dependientes de agonista parece que no juega ningún papel a este respecto (Campbell et al., 1991).

Por otro lado, no está claro que el secuestro de receptores implique que hayan de ser degradados. Se ha observado que mutaciones en dos residuos de tirosina localizados en la zona carboxiterminal del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico evitan totalmente la down-regulation del receptor sin impedir su secuestro (Valiquette et al., 1990). Curiosamente, se ha observado la presencia de ambos residuos tirosina en diferentes receptores acoplados a proteína G, y se postula que estos residuos serían reconocidos por una proteína adaptadora que mediaría la internalización vía vesículas recubiertas de clatrina. Se ha especulado mucho a cerca del mecanismo que media en la down-regulation de receptores acoplados a proteína G. Von Zastrow and Kobilka (1992) postularon que tan sólo una pequeña proporción de receptores que entran en el interior celular (por secuestro e internalización) serán dirigidos hacia los compartimentos lisosomales para ser degradados, mientras que la gran mayoría se recicla hacia la superficie celular (Maloteaux and Hermans, 1994). Los receptores que sufren esta degradación son los que poseen una señal determinada, al parecer localizada en dos residuos tirosina del receptor (Valiquette et al., 1990).

Recientemente, ha emergido la idea de que la internalización de los receptores, ocasionada por el agonista, no sólo serviría para down-regular al receptor (disminuyendo la sensibilidad por el agonista), sino que esta internalización sería necesaria para desencadenar efectos a largo plazo (Hermans et al., 1994). Los efectos a corto y largo plazo parecen que están mediados por diferentes sistemas (Figura 10).

Finalmente, la down-regulation de los receptores acoplados a proteínas G puede estar mediada vía la reducción del ARNm que codifica para estos receptores (Bouvier et al., 1989; Hadcock and Malbon, 1988). Esta reducción es debida a la desestabilización del ARNm, originada por proteínas específicas que se unen a este ARNm (Port et al., 1992). No resulta nada claro si esta desestabilización del ARNm inducida por el agonista es mediada por quinasas específicas de agonista o por quinasas efectoras. Esta reducción del ARNm inducida por el agonista ha sido descrita para muchos receptores acoplados a proteínas G, tales como el

receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Hadcock et al 1989 b), el receptor de TRH (Akamizu et al., 1990), el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Izzo et al., 1990), y los receptores muscarínicos m1, m2 y m3 (Wang et al., 1990; Fukamauchi et al., 1991).

Como en el caso de la alteración de la función del receptor, los diferentes subtipos de receptores dentro de una misma familia pueden mostrar una marcada diferencia en sus patrones de down-regulation. Por ejemplo, mientras los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos muestran una elevada down-regulation mediada por el agonista, con los  $\beta_1$ -adrenérgicos la down-regulation es modesta y los  $\beta_3$ -adrenérgicos prácticamente no la presentan (Nantel et al., 1993; Suzuki et al., 1992; Thomas et al., 1992). Es interesante notar que en los casos en que el receptor sufre una marcada desensibilización, éste muestra un mayor desacoplamiento del efector, un mayor grado de secuestro y una mayor down-regulation. Esta observación sugiere que los mecanismos que regulan a los receptores actúan de manera coordinada.

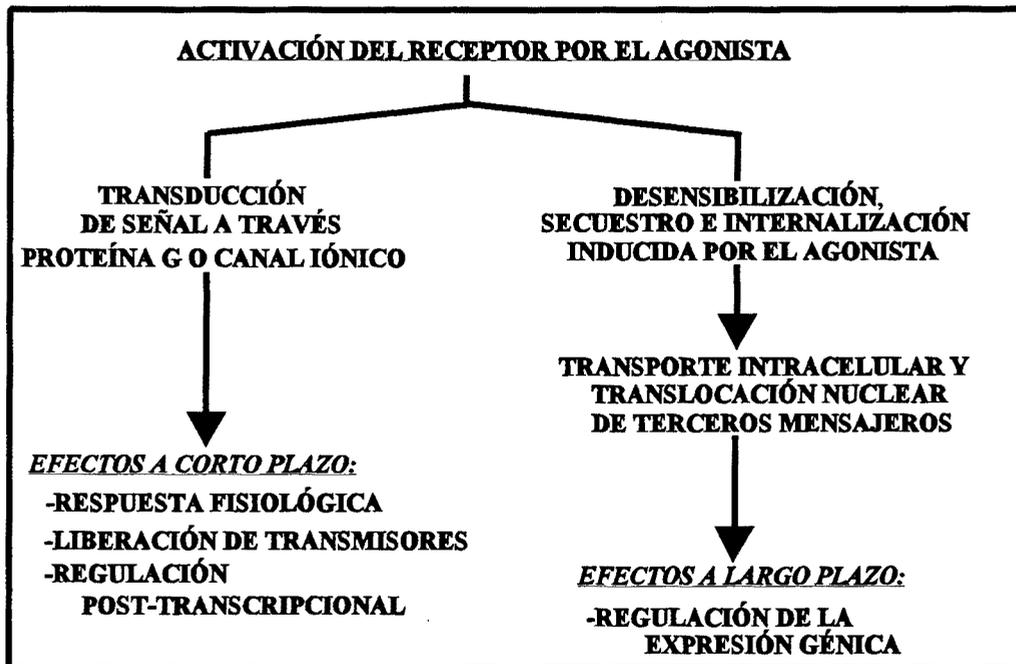


Figura 10. Esquema ilustrativo de los dos niveles a través de los cuales el receptor activado por el agonista ejerce efectos a corto y largo plazo.



## **B. RESULTADOS.**



## **B. RESULTADOS.**

### **B.1. Solubilization and molecular characterization of the nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes.**

Francisco Ciruela, Julià Blanco, Enric I.Canela, Carmen Lluís, Rafael Franco and Josefa Mallol (1994).

*Biochimica et Biophysica Acta* **1191**, 94-102.



## Solubilization and molecular characterization of the nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes

Francisco Ciruela, Julià Blanco, Enric I. Canela, Carmen Lluís, Rafael Franco, Josefa Mallol \*

*Departament de Bioquímica i Fisiologia, Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular A, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1,  
08028-Barcelona, Spain*

(Received 18 October 1993)

### Abstract

The nitrobenzylthioinosine binding sites from luminal membranes of proximal tubule of pig kidney were solubilized by treatment of the brush-border membrane vesicles with the zwitterionic detergent CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate) in 2% solution. The high yield solubilization of a stable form of the transporter took place in the presence of adenosine in the medium of incubation with the detergent and the additional presence of glycerol as stabilizer. The solubilization of the NBTI-sensitive nucleoside transporter from pig kidney brush-border membranes did not change the nitrobenzylthioinosine (NBTI) binding characteristics; the only major change was a 3-fold decrease in the affinity. The carrier molecule was cross-linked to [<sup>3</sup>H]NBTI and by electrophoretic characterization under reducing conditions it displayed a molecular mass of 65 kDa. Treatment of the samples at low temperature prior to electrophoresis gave rise to the appearance of further bands corresponding to dimeric and tetrameric forms which interacted non-covalently. The removal of the N-linked oligosaccharides by treatment with endoglycosidase F shifted the molecular mass to 57 kDa. The chromatographic behaviour of the solubilized transporter was similar to that of human erythrocytes and differed from that found in pig erythrocytes. Since the molecular mass of the monomer before and after treatment with endoglycosidase F is the same for pig erythrocytes and pig kidney luminal membranes, the different chromatographic behaviour might result from tissue differences due to transcriptional variations or to posttranscriptional modifications of the transporter molecule.

**Key words:** NBTI-sensitive nucleoside transport; Nucleoside transport; Kidney; Solubilization; Adenosine; Nitrobenzylthioinosine; Brush-border membrane

### 1. Introduction

The action of adenosine in the kidney is as varied as the many cell types found in this organ. Its regulatory effects in the rate and distribution of renal blood flow, glomerular filtration, hormone and neurotransmitter release and tubular reabsorption have been summarized in a number of reviews [1–4], in which the effect of exogenous adenosine has been analysed and the role of endogenous adenosine as mediator of several physiological and pathophysiological phenomena has been postulated.

The interaction of adenosine with high-affinity spe-

cific receptors on the cell surface mediates many of the effects of the nucleoside in mammalian tissues. Both the presence of adenylate cyclase stimulating and inhibiting adenosine receptors and the coupling of these receptors to other effector systems have also been demonstrated in the kidney [5–7].

However, the multiple effects exerted by adenosine in the kidney cannot be explained only on the basis of its interaction with specific receptors and it is clear that other processes, such as the release and uptake of the nucleoside and its intra and extracellular metabolism, must participate in the control of the adenosine actions. Thus, for instance, recovery of the intracellular nucleotide pool from exogenous adenosine has been demonstrated in guinea pig kidney slices [8]. It becomes clear that a number of events in kidney are

\* Corresponding author. Fax: +34 3 4021219.

mediated upon uptake by the cells of extracellular adenosine. It is in this context that we are interested in the study of the nucleoside transport in brush-border membrane vesicles (BBM) and in the proteins functionally involved in it. It has been reported that renal brush-border membrane adenosine transport shows two components, one sodium-independent and the other sodium-dependent [9–12]. In mammalian cell membranes the sodium-independent component is mediated by two equilibrative (facilitated diffusion) transporters with similar kinetic properties, but with differences in their sensitivity to the inhibitor nitrobenzylthioinosine (NBTI). The NBTI-sensitive transporter ('es' as proposed by Vijayalakshmi and Belt [13]) possesses a high-affinity NBTI binding site and is inhibited by nanomolar concentrations of NBTI. Conversely, the NBTI-insensitive equilibrative transporter ('ei' as proposed by Vijayalakshmi and Belt (loc. cit.)) is not affected by NBTI at concentrations up to 1  $\mu\text{M}$  and lacks the high-affinity binding site for the inhibitor (for reviews see [14,15]). On the other hand, the two concentrative transporters that mediate the sodium dependent transport in normal and neoplastic mammalian cells ('cif' and 'cit' in the terminology of Vijayalakshmi and Belt (loc. cit.)) are insensitive to NBTI [9,13,16–18]. Therefore, the binding of the potent inhibitor NBTI is usually used to quantify the presence of the NBTI-sensitive nucleoside transport in agreement with the general assumption that the high affinity NBTI binding sites are associated with the NBTI-sensitive transporter.

Solubilization and characterization of kidney NBTI-binding sites from pig proximal tubules provides a direct means to elucidate the molecular properties of the NBTI-sensitive carriers expressed in these particular membranes of the kidney and to establish the possible influence of the membrane environment on their pharmacological and biochemical characteristics. By means of high affinity probes such as [ $^3\text{H}$ ]NBTI, solubilization and characterization of the NBTI-sensitive nucleoside transporter from erythrocytes have been reported [19–23]. Concerning other cell types, only few studies have been reported on the solubilization of the transporter from brain [24] and from Erlich ascites tumour cells [25]. The aim of this study has been the solubilization and characterization of the NBTI-sensitive nucleoside transporter from pig kidney BBM.

## 2. Materials and methods

### Materials

[ $^3\text{H}$ ]NBTI (nitrobenzylthioinosine, [benzyl- $^3\text{H}$ ]) (30 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear Research Products (Boston, USA). Inosine, uridine, NBTI (nitrobenzylthioinosine), Triton X-100, 50%

polyethylenimine, pepstatin, aprotinin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), deoxycoformycin, cytochalasin B and glucose were from Sigma (St. Louis, USA). Adenosine, adenosine deaminase, leupeptin, bestatin and CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate)) were from Boehringer Mannheim (Germany). DEAE-Sepharose, and CM-Sepharose were from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden). Dipyridamole was kindly provided by Dr. Cembrano from Boehringer Ingelheim (Barcelona, Spain). Stock solutions of NBTI (1  $\mu\text{M}$ ) were prepared in DMSO.

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.

### Methods

*Preparation of luminal membranes from pig kidney proximal tubule.* Luminal membranes (Brush-border membranes, BBM) were isolated by a magnesium precipitation method described by Vannier et al. [26] and modified by Lin et al. [27]. Briefly, after perfusion, cortex was removed from pig kidneys and placed in 10 mM mannitol, 2 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1). Homogenization was performed in 5 volumes of the Tris-mannitol buffer using a Polytron disrupter (PTA 20TS rotor, setting 5) (Kinematica, Lucerne, Switzerland) for three periods of 10 s separated by intervals of 20 s. After homogenization, 1 M  $\text{MgCl}_2$  was added to a final concentration of 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . The final mixture was stirred for 15 min and centrifuged for 12 min at  $2000 \times g$ . The supernatant was removed and centrifuged for 1 h at  $60\,000 \times g$ . The pellet was suspended in 150 ml of 170 mM KCl, and 2 volumes of 200 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) were added to the suspension. This suspension was centrifuged for 15 min at  $3000 \times g$ , and the supernatant was centrifuged for 1 h at  $60\,000 \times g$ . The final pellet (BBM) was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) to a final protein concentration of 20–30 mg/ml. All steps were carried out at  $4^\circ\text{C}$ . Membrane suspensions were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . In the final membrane fraction the marker enzyme alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) was enriched 9–11-fold.

Where indicated, BBM were obtained in the presence of a cocktail of protease inhibitors composed of 1  $\mu\text{M}$  leupeptin, pepstatin, aprotinin, and bestatin, 200  $\mu\text{M}$  PMSF and 100  $\mu\text{M}$  EDTA; then, the cocktail was included in all the buffers used in the BBM preparation.

*Protein determination.* Protein was measured by the bicinchoninic acid method, BCA, (Pierce), as described Sorensen and Brodbeck [28].

*Solubilization.* Unless otherwise indicated, solubilization was performed using glycerol and the natural substrate adenosine as stabilisers of the NBTI-sensitive

nucleoside transporter during solubilization, and the removal of the stabilizing products before the assay of solubilized binding sites. Briefly, the membranes (15 mg/ml) were incubated with 20 mM adenosine, 1 h at 25°C, and then with 20% (v/v) glycerol for 5 min at 4°C before solubilization with 32.6 mM (2% w/v) CHAPS. After incubation with the detergent for 30 min at 4°C, the mixture was centrifuged at 80 000 × *g* for 90 min at 4°C. The supernatant, which constituted the solubilized preparations, contained 70% of protein in the intact membranes. Solubilized preparations (10 mg protein/ml) were filtered through a Sephadex G-50 column (0.9 × 15, K-9, Pharmacia, Sweden), previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing 2 mM (0.123% w/v) CHAPS. Samples of 1 ml of solubilized preparations were applied and eluted with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), containing 2 mM (0.123% w/v) CHAPS, at a flow rate of 8 ml/h. The protein containing fractions, as measured by the BCA method, were combined and constituted the sample used in the binding assays.

**[<sup>3</sup>H]NBTI binding assays.** [<sup>3</sup>H]NBTI binding to intact BBM was measured after incubating the membranes (final protein concentration 0.7–0.8 mg protein/ml of suspension) with adenosine deaminase (0.2 U/ml) for 30 min at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Radioligand and modulators or displacers were then added at varying concentrations (see Section 3). After standing at 25°C until equilibrium was achieved (usually 1 h for the lowest ligand concentration and 20 min for the highest ligand concentration), free and bound radioligand were separated by rapid filtration of 500-μl aliquots through Whatman GF/C filters, which were subsequently washed in 10 ml of ice-cold Tris-HCl buffer. The filters were presoaked in 0.3% polyethylenimine (2–4 h, pH 10) to improve performance. Radioligand binding to solubilized BBM was performed upon incubation of the eluates (0.7–0.8 mg protein/ml) with adenosine deaminase (0.2 U/ml) for 30 min at 25°C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Radioligands, modulators or displacers were then added. After standing at 25°C until equilibrium was achieved (as with membranes), free and bound radioligand were separated by rapid filtration of 500-μl aliquots through Whatman GF/B filters, which were subsequently washed in 10 ml of ice-cold Tris buffer. The filters were also presoaked in 0.3% polyethylenimine (2–4 h, (pH 10)). Nonspecific binding was determined in the presence of an excess (200–500-fold) of cold ligand.

In all cases, after filtration, the filters were placed in standard vials with 10 ml of Formula-989 liquid scintillation cocktail (New England Nuclear). After an interval of at least 12 h, the vials were counted in a Packard 1600 TRICARB liquid scintillation counter with an efficiency of 50%.

**Data analysis.** Data from saturation isotherms and displacement curves were analysed by non-linear regression using the ENZFITTER program (Elsevier Biosoft) as described elsewhere [29,30]. Total binding was fitted to a function corresponding to the sum of specific binding to the carrier plus nonspecific binding (assuming that this was linear with ligand concentration), to avoid systematic errors. As previously demonstrated [29], the inclusion of the nonspecific binding component in the model gives the same values of equilibrium binding parameters, but avoids the spread of values of experimentally determined nonspecific binding:

$$\text{Total binding} = \frac{R [L]}{K_D + [L]} + K_n [L]$$

where  $K_n$  denotes the constant for nonspecific binding and  $R$  is the maximum specific binding. Three to five replicates of each point were performed. Goodness of fit was tested according to the reduced  $\chi^2$  or S.D. values given by the program.

**Photoaffinity labelling.** Membranes (0.7 mg protein/ml) were equilibrated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 5 nM [<sup>3</sup>H]NBTI in the absence or presence of different competing nonradioactive ligands for 60 min at 25°C. Photolysis was then carried out in 3-ml perspex spectrophotometer cuvettes by 10 s exposure to a 200 W mercury lamp (Applied Photophysics) at a distance of 4 cm from the lamp housing. After irradiation, an excess (500-fold) of unlabelled NBTI was added and then allowed to stand at 25°C for 1 h before being filtered and washed in cool buffer to determine the covalently bound [<sup>3</sup>H]NBTI. Photolabelled membranes were collected by centrifugation at 60 000 × *g* for 1 h.

**Endoglycosidase F treatment.** [<sup>3</sup>H]NBTI labelled membranes (4 mg protein/ml) were treated with endoglycosidase F as described by Stiles [31]. In short, photolabelled membranes were solubilized (30 min at 37°C with constant stirring) in 1% Triton X-100, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.1) containing 30 mM EDTA and 0.05% SDS. The suspension was then centrifuged at 80 000 × *g* for 90 min at 4°C. The supernatants (2.6 mg protein/ml) were then aspirated and divided into aliquots (80 μl); endoglycosidase F (1 U/mg protein) or the same amount of solubilization buffer, was added and incubation was carried out at 37°C for 18 h. Enzymatic digestion was terminated by the addition of 12 μl of concentrated (8 × ) SDS-PAGE sample buffer solution and treated for 1 min at 100°C.

**Ion exchange chromatography.** BBM (0.7 mg protein/ml) was radiolabelled as indicated in the absence or presence of 2 μM NBTI in order to determine nonspecific binding. Membranes were then treated with 1% Triton X-100 in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at 37°C and then centrifuged at 80 000

$\times g$  for 90 min at 4°C. The detergent extract was applied to a carboxymethyl Sepharose exchanger (CM-Sepharose) column (15  $\times$  80 mm), which was equilibrated with 0.1% Triton X-100 in the sodium acetate buffer. The column was eluted with the same buffer at a flow rate of 20 ml/h and 1-ml aliquots were collected. After 20 ml, a linear gradient (0–0.2 M NaCl) of 100 ml was applied and the column was washed with 0.5 M NaCl. The void-volume fractions (5 ml) of CM-Sepharose were collected and dialysed overnight against an excess of 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) containing 0.1% Triton X-100. The resulting extract was applied to a diethylaminoethyl exchanger column (DEAE-Sepharose) equilibrated with the same buffer. Protein adsorbed to the column was eluted with a linear salt gradient 0–0.2 M NaCl in 5 mM Tris-HCl, 0.1% Triton buffer (pH 8.3). Fractions containing [<sup>3</sup>H]NBTI photolabelled protein (void-volume of DEAE-Sepharose) were pooled and lyophilized, and brought up to 60  $\mu$ l with SDS-PAGE sample buffer solution and treated for 1 min at 100°C for electrophoretic analysis.

*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*. Photolabelled membranes were washed once and dissolved in (2  $\times$ ) SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl, 2% SDS, 20% glycerol, 2% mercaptoethanol, 0.002% Bromophenol blue (pH 6.8)) and treated for 1 min at 100°C or 1 h at 37°C. The electrophoresis was performed according to the method of Laemmli [32] using homogeneous slab gels containing 12.5% acrylamide separating gel, which were run at constant voltage. After running, the gel was fixed (10% acetic acid, 10% methanol and 80% water), treated with Amplify (Amersham) for fluorographic detection and dried at 80°C in a gel drier (Bio-Rad). Dry gels were subjected to autoradiography at –80°C. When low amounts of radioactivity were applied the gel was cut in 1.2-mm slices, which were dissolved with Solvable (Du Pont) for 3 h at 75°C, then 10 ml liquid scintillation was added, and radioactivity was counted.

### 3. Results

#### *Solubilization of NBTI binding sites from BBM*

The presence of the NBTI-sensitive nucleoside transporter in the solubilized membrane fractions and the percentage of non-solubilized binding sites remaining in the pellet was evaluated by measurement of the [<sup>3</sup>H]NBTI specific binding. Binding assays were performed as described in Section 2 with a fixed [<sup>3</sup>H]NBTI concentration (0.5 nM); nonspecific binding was determined in the presence of 1  $\mu$ M NBTI. The incubation of kidney BBM (15 mg/ml) with the non-ionic detergent Triton X-100 caused the total denaturation of the NBTI-sensitive nucleoside transporter, although the

Table 1  
Solubilization of [<sup>3</sup>H]NBTI binding sites

Treatment	% Solubilized protein	% Non-solubilized binding sites	% Solubilized binding sites
0.5% Triton X-100	48 $\pm$ 10	0	0
2% CHAPS	52 $\pm$ 4	8 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
2% CHAPS + 20% glycerol + 20 $\mu$ M adenosine <sup>a</sup>	73 $\pm$ 10	12 $\pm$ 3	41 $\pm$ 16

Pig kidney BBM (15 mg/ml) were incubated (30 min at 25°C) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing the indicated additives. The suspension was centrifuged at 80000  $\times g$  for 90 min (4°C). Supernatants and pellets were used for binding assay with a fixed [<sup>3</sup>H]NBTI concentration (0.5 nM); nonspecific binding was determined in presence of 1  $\mu$ M NBTI. 100% binding refers to the value found for untreated BBM (0.6 pmol/mg protein) under the same experimental conditions. Values are mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

<sup>a</sup> The membranes were incubated with adenosine 20  $\mu$ M, 1 h at 25°C, and then with 20% (v/v) glycerol for 5 min at 4°C before their solubilization with 2% (w/v) CHAPS.

yield of solubilized proteins was relatively high (Table 1). Treatment with 2% CHAPS solubilized 52% of total protein but the recovery of [<sup>3</sup>H]NBTI binding sites was very low (Table 1). With regard to the low percentage of binding sites remaining in the membrane after solubilization, 2% CHAPS solubilized the NBTI-sensitive nucleoside transporter in a form that was unable to bind NBTI. An approach to raise the yield was the addition of glycerol, reported as general stabilizer of proteins in solution [24], and of adenosine, which usually improves the efficacy of solubilization in the case of adenosine binding molecules [33]. In these conditions 41% of the [<sup>3</sup>H]NBTI binding sites were solubilized (Table 1) though upon elimination of adenosine and excess glycerol the yield rose to 60%. Elimination of the glycerol excess and dilution of the CHAPS below its critical micellar concentration (CMC = 8 mM) was achieved by gel permeation using Sephadex G-50 equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.123% CHAPS. The recovery was the 75% of the applied protein. Adenosine was eliminated by preincubation of the solubilized fraction with adenosine deaminase before the radioligand binding. Changes in the detergent/protein ratio showed ratio 1 as the most suitable to increase the stability of the solubilized preparations (data not shown). When assayed after 11 days of storage at either 4°C or –20°C all the extracts retained the same [<sup>3</sup>H]NBTI binding capacity shown shortly after solubilization. Neither an increase in ionic strength by addition of 100 mM NaCl, nor the addition of 1 mM EDTA improved the solubilization by 2% CHAPS plus 20% glycerol (data not shown).

### Characterization of the [<sup>3</sup>H]NBTI binding to solubilized pig kidney BBM

Saturation analysis of the [<sup>3</sup>H]NBTI binding to solubilized BBM led to the determination of one affinity state (Fig. 1). The parameter values at equilibrium deduced from the saturation isotherms (see Section 2; values are mean  $\pm$  S.D. of four independent experiments) showed that the maximum specific binding ( $B_{\max} = 0.82 \pm 0.05$  pmol/mg protein) was similar to that of intact BBM ( $B_{\max} = 0.97 \pm 0.05$  pmol/mg protein), whereas the value of  $K_d$  in the detergent extracts was greater ( $K_d = 3.7 \pm 0.9$  nM) than that in BBM ( $K_d = 1.1 \pm 0.3$  nM), indicating that the process of solubilization causes a decrease in the affinity of the NBTI-sensitive nucleoside transporter. The fact that the binding sites remaining in the detergent-treated membranes presented a  $K_d$  of  $1.7 \pm 0.8$  nM, which is similar to that found in intact membranes, suggests that the decrease in affinity is a consequence of the state of the transporter in the solubilized form, rather than an effect of the solubilization treatment. The  $B_{\max}$  value for detergent-treated membranes was  $0.51 \pm 0.1$  pmol/mg protein.

Displacement experiments were performed using [<sup>3</sup>H]NBTI as ligand and dipyrindamol, adenosine, inosine, uridine, NBTI, cytochalasin B, and glucose as displacers. The order of potency of the NBTI-sensitive nucleoside transport substrates and inhibitors (NBTI > dipyrindamol > adenosine > inosine > uridine) as displacers, was the same in the intact BBM and in the solubilized preparations (Table 2), indicating that the NBTI binding sites in the solubilized pig kidney membranes display the same specificity as in the intact BBM vesicles. On the other hand, the increase in the

Table 2

Inhibition constants for displacers of [<sup>3</sup>H]NBTI specific binding to intact and solubilized pig kidney BBM

Displacer	$K_i$ ( $\mu$ M)	
	Intact BBM	Solubilized BBM
NBTI	$0.0009 \pm 0.0001$	$0.0065 \pm 0.0001$
Dipyrindamol	$0.009 \pm 0.002$	$0.023 \pm 0.003$
Adenosine	$83 \pm 9$	$100 \pm 1$
Inosine	$300 \pm 60$	$900 \pm 200$
Uridine	$780 \pm 80$	$1600 \pm 300$
Cytochalasin B	$11 \pm 2$	n.d.
Glucose	$> 6 \cdot 10^5$	n.d.

Experimental conditions are those described in Section 2. The fixed [<sup>3</sup>H]NBTI concentration was that producing a 20% saturation of total binding sites: 0.5 nM in the displacement of [<sup>3</sup>H]NBTI binding to intact pig kidney BBM, and 2.5 nM in the displacement of [<sup>3</sup>H]NBTI binding to solubilized BBM. The concentrations of the displacers were variable in the following ranges: NBTI (0.1 nM–10  $\mu$ M), dipyrindamol (1 nM–100  $\mu$ M), adenosine (316 nM–10 mM), inosine (1  $\mu$ M–31 mM), and uridine (3  $\mu$ M–100 mM), cytochalasin B (100 nM–1 mM), and glucose (100  $\mu$ M–1 M). Results are taken from the displacement curves obtained from five replicates and were fitted using a non-linear regression program as indicated in Section 2. Values are mean  $\pm$  S.D. given by the fitting program.

$K_i$  values determined for the solubilized form (Table 2) corroborates the decrease in affinity of the nucleoside transporter for the NBTI binding in the solubilized preparations. When the displacer was adenosine, an inhibitor of adenosine deaminase (200 nM deoxycytosine) was used to prevent hydrolysis of the nucleoside during the binding assay (see Section 2).

The high  $K_i$  values determined using glucose and cytochalasin B as displacers indicated that the high-affinity binding of [<sup>3</sup>H]NBTI is to the NBTI-sensitive nucleoside transporter rather than to the glucose trans-

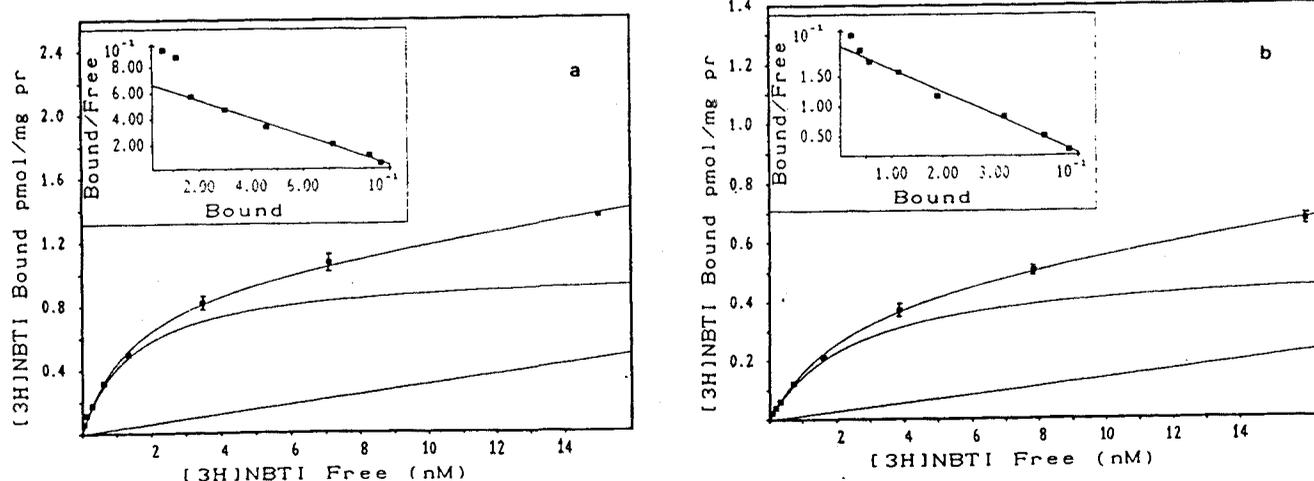


Fig. 1. Isotherms of [<sup>3</sup>H]NBTI binding to BBM. Saturation analysis of [<sup>3</sup>H]NBTI binding to (a) intact pig kidney BBM vesicles and (b) soluble extracts, was performed as described in Section 2. The concentration of [<sup>3</sup>H]NBTI varied in the range 0.1–15 nM. Nonspecific binding was determined in the presence of a 200-fold excess of NBTI. All points represent the mean  $\pm$  S.E. of five replicates and the curves shown are representative of four separate experiments. Data were adjusted using a non-linear regression program as described in Section 2. Inset: Scatchard plot of the computer-derived specific binding data.

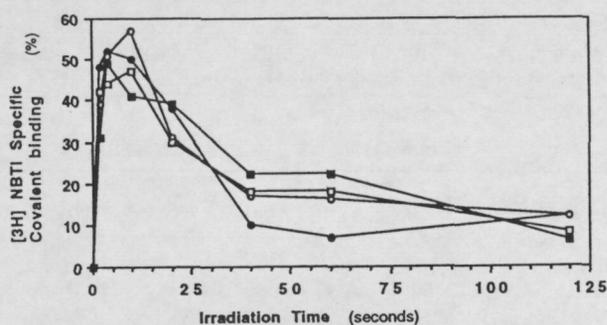


Fig. 2. Efficiency of [ $^3\text{H}$ ]NBTI photoaffinity labelling. BBM (0.7 mg protein/ml) were equilibrated with 5 nM [ $^3\text{H}$ ]NBTI in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 30 min. The incubation mixtures were then exposed to UV light at different distances from the lamp (cm): ( $\bullet$ ) 2; ( $\circ$ ) 4; ( $\square$ ) 10; ( $\blacksquare$ ) 20. At the indicated exposure times, 2  $\mu\text{M}$  NBTI was added to each sample in order to determine the covalent binding (see Section 2). Values are given as percent of the total binding.

porter. In fact, when analysing the [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to the glucose transporter, Jhun et al. [34] reported  $K_c$  values in the micromolar range.

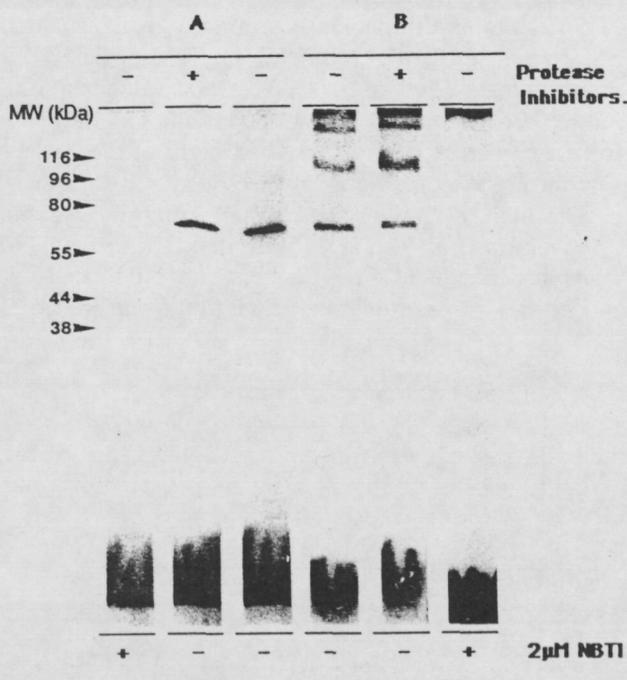


Fig. 3. SDS-PAGE of the NBTI-sensitive nucleoside transporter labelled with [ $^3\text{H}$ ]NBTI. BBM (0.7 mg protein/ml) were equilibrated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 5 nM [ $^3\text{H}$ ]NBTI in absence and the presence of 2  $\mu\text{M}$  NBTI and/or a cocktail of protease inhibitors (1  $\mu\text{M}$  of leupeptin, pepstatin, aprotinin, and bestatin; 200  $\mu\text{M}$  PMSF; 100  $\mu\text{M}$  EDTA). Samples were placed at 4 cm from the lamp and exposed to UV light for 10 s. Unreacted  $^3\text{H}$ -ligand was removed by washing with buffer. Labelled BBM were dissolved for SDS-PAGE as indicated in Section 2 and treated for 1 min at 100°C (A) or 1 h at 37°C (B) prior to electrophoresis. The gel was run, dried and autoradiographed as described in Section 2.

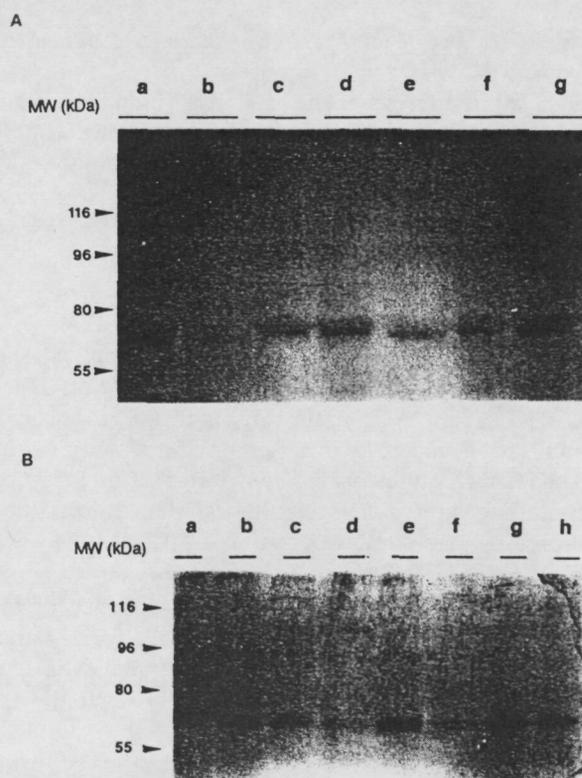


Fig. 4. Specificity of the [ $^3\text{H}$ ]NBTI photoaffinity labelling. Membranes (0.7 mg protein/ml) were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) with 5 nM [ $^3\text{H}$ ]NBTI in absence (control) or in presence of glucose (A) or nucleoside transporter (B)-specific ligands. Samples were placed at 4 cm from the lamp and exposed to UV light for 10 s. Membranes were washed with buffer to eliminate the excess reagents and treated for SDS-PAGE for 1 min at 100°C. The gel was run, dried and autoradiographed as described in Section 2. Quantitative densitometry of the autoradiographs was performed using a Computing Densitometer (Molecular Dynamics). Values are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments. (A) Control (a): 222  $\pm$  16; 666 mM glucose (b): 116  $\pm$  9; 200 mM glucose (c): 169  $\pm$  2; 1 mM glucose (d): 261  $\pm$  10; 25  $\mu\text{M}$  cytochalasin B (e): 155  $\pm$  5; 5  $\mu\text{M}$  cytochalasin B (f): 162  $\pm$  8; 0.5  $\mu\text{M}$  cytochalasin B (g): 189  $\pm$  30. (B) 5 nM NBTI (a): 88  $\pm$  11; Control (b): 185  $\pm$  12; 10 nM dipyrindamole (c): 113  $\pm$  9; 10  $\mu\text{M}$  dipyrindamole (d): 81  $\pm$  14; 100  $\mu\text{M}$  adenosine (e): 140  $\pm$  13; 10 mM adenosine (f): 62  $\pm$  9; 800  $\mu\text{M}$  uridine (g): 146  $\pm$  2; 10 mM uridine (h): 86  $\pm$  9.

**Photoaffinity labelling.** The photoaffinity labelling of NBTI-sensitive nucleoside transporter by [ $^3\text{H}$ ]NBTI was performed under the conditions described in Section 2. Using different distances from the lamp and different times (Fig. 2) the greatest efficiency in the [ $^3\text{H}$ ]NBTI cross-linking (57% of the total nucleoside transporter present at the BBM) was found when the irradiation was for 10 s at 4 cm of the lamp. At higher irradiation times the specific covalent binding of [ $^3\text{H}$ ]NBTI was reduced due to a pronounced increase in nonspecific binding.

SDS-PAGE of affinity labelled BBM was developed after treatment of the samples in two different ways.

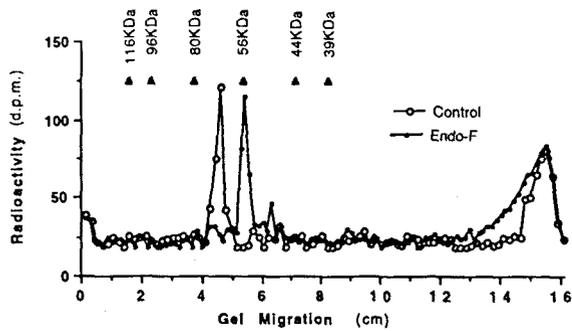


Fig. 5. Effect of endoglycosidase F on the NBTI-sensitive nucleoside transporter electrophoretic mobility. [ $^3\text{H}$ ]NBTI affinity labelled BBM (see legend of Fig. 4 for the control samples) were solubilized (4 mg protein/ml) with 30 mM EDTA, 0.05% SDS, 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer (pH 6.1) containing 1% Triton X-100. Then, 1 U/mg protein of endoglycosidase F (●) or the same amount of solubilization buffer in a control sample (○), were added to the extracts. After 18 h at 37°C samples were treated with SDS and the SDS-PAGE was performed. The gel was run and dried as indicated in Section 2. The gel was cut into 1.2-mm slices, which were dissolved with Solvable (Du Pont) for 3 h at 75°C and the radioactivity was counted in a liquid scintillation counter.

The lane corresponding to the labelled membranes treated with the SDS sample buffer for 1 min at 100°C showed a single sharp radioactive band (Fig. 3, panel A) of 65 kDa which disappeared in the presence of 2  $\mu\text{M}$  NBTI. However, when the labelled membranes were treated with sample buffer for 1 h at 37°C (Fig. 3, panel B) three molecular polypeptides were specifically photolabelled with [ $^3\text{H}$ ]NBTI; their approximate molecular masses were 65 kDa, 110 kDa, and 230 kDa, which suggests that they correspond to the monomeric, dimeric and tetrameric forms of the NBTI-sensitive nucleoside transporter. No differences were found when the membranes were obtained in the presence or absence of a cocktail of protease inhibitors (see Section 2).

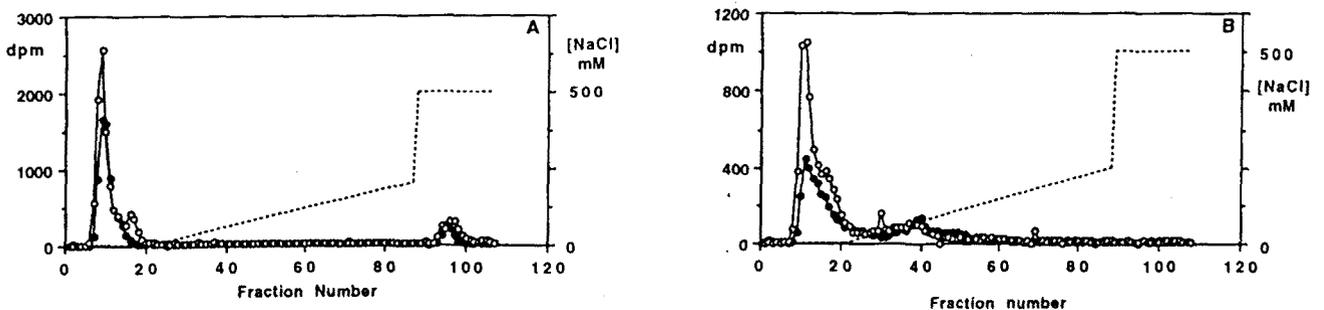


Fig. 6. Ionic exchange chromatography of the NBTI-sensitive nucleoside transporter. [ $^3\text{H}$ ]NBTI radiolabelled BBM in the presence (●) or in the absence (○) of 2  $\mu\text{M}$  NBTI (see legend of Fig. 4 for the control samples) were solubilized with 1% of Triton X-100 in 5 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). The soluble fraction was chromatographed through a carboxymethyl column (CM-Sepharose) equilibrated with the same buffer but containing 0.1% Triton X-100 (A). The void-volume fractions of the CM-Sepharose elution were collected and dialysed overnight against an excess of 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3) containing 0.1% Triton X-100. The dialysed fraction was chromatographed through a diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose gel (B) equilibrated with the same buffer. In both cases, elution was performed with a linear gradient of 0–0.2 M NaCl (100 ml total volume of gradient, at a flow rate of 1 ml/min). Radioactivity of the eluted samples was determined as described in Section 2.

The specificity of the photoaffinity binding of NBTI was assessed by competition with ligands specific for the glucose or the NBTI-sensitive nucleoside transporter. The conditions of the photolabelling were those described above but, with the addition of the corresponding reagent: glucose or cytochalasin B as specific for the glucose transporter, and NBTI, dipyrindamole, adenosine and uridine as specific for the nucleoside transporter. Pelleted membranes were treated with SDS sample buffer for 1 min at 100°C and subjected to SDS-PAGE. As shown in Fig. 4, neither glucose nor cytochalasin B competed for the covalent binding (panel A) whereas all ligands specific for the nucleoside transporter led to the disappearance of the control band (panel B). This demonstrates that the [ $^3\text{H}$ ]NBTI photoaffinity cross-linking was highly specific for the NBTI-sensitive nucleoside transporter.

Treatment with endoglycosidase F of the monomeric form of the transporter led to a shift in molecular mass, from 65 kDa to 57 kDa, indicating that the molecule of the NBTI-sensitive nucleoside transporter has N-linked oligosaccharides (Fig. 5).

*Characterization of the transporter.* The NBTI-sensitive nucleoside transporter from BBM was partially purified using ionic exchange chromatography. Due to the fact that CHAPS is a zwitterionic detergent that would interfere in the chromatographies, the non-ionic detergent Triton X-100 (1%) was used to solubilize the BBM in which the transporter molecules were previously cross-linked to [ $^3\text{H}$ ]NBTI. Both anionic and cationic exchange were sequentially attempted. Thus, detergent extracts from [ $^3\text{H}$ ]NBTI affinity labelled membranes were first chromatographed using CM-Sepharose equilibrated with 0.1% Triton X-100 in sodium acetate buffer at pH 5. The active fractions, as measured by the radioactivity of the eluates, were found in the void volume, whereas no sign of the transporter appeared during the salt gradient (Fig.

6A). The degree of purification in this step was 2.5. Active fractions were pooled, dialysed against 0.1% Triton X-100 in a Tris-HCl buffer (pH 8.3) and chromatographed in a DEAE-Sepharose column equilibrated with the same buffer (Fig. 6B). Under these conditions, active fractions also appeared in the void volume and the degree of purification in this step was 5.3, allowing a total degree of purification of 13.

#### 4. Discussion

The procedure established for the solubilization of proteins from pig kidney BBM is very effective, as indicated by the high yield of the solubilization of the NBTI-sensitive nucleoside transporter. The binding of the specific ligand, [<sup>3</sup>H]NBTI, was used to quantify the presence of this nucleoside transporter in the intact membranes and in the solubilized preparations. The use of glycerol and adenosine considerably increased the stability of the solubilized transporter, as can be deduced from the values of the binding sites that remain in the membranes after detergent treatment. Moreover, the reconstitution of the transporter by the elimination of the excess of glycerol and detergent by gel filtration provides a notable recovery of the NBTI binding sites, suggesting that the transporter is more accessible to [<sup>3</sup>H]NBTI binding in the absence of glycerol rather than in its presence and after decreasing the CHAPS concentration below its critical micellar concentration (CMC = 8 mM). Although high yield procedures for solubilization of NBTI-sensitive nucleoside transporter from erythrocytes have been reported [19,20,22,23,35], no procedure for the solubilization of the transporter from kidney has yet been described. The solubilization of the NBTI-sensitive nucleoside transporter from pig kidney BBM did not change its NBTI-binding characteristics, as shown by the order of potency of nucleosides as displacers; the only major change was a 3-fold decrease in affinity. On the other hand, the high  $K_i$  found for glucose and cytochalasin B as displacers of the [<sup>3</sup>H]NBTI binding indicates that the glucose transporter did not interfere in the characterization of the NBTI-sensitive transporter. Furthermore, the [<sup>3</sup>H]NBTI photoaffinity labelling performed on intact BBM leads to the cross-linking of the ligand to this nucleoside transporter, since the specific band obtained by SDS-PAGE is only displaced by using adenosine, NBTI, dipyrindamole or uridine (Fig. 4B). The NBTI binding is highly specific for this nucleoside transporter, since glucose and cytochalasin B did not compete with [<sup>3</sup>H]NBTI in these assays (Fig. 4A).

The characterization by SDS-PAGE of the nucleoside transporter cross-linked to [<sup>3</sup>H]NBTI led to different results, depending on how the samples were prepared. When treatment was for 1 min at 100°C with

SDS sample buffer, only one band of 65 kDa was detected for the NBTI-sensitive nucleoside transporter in pig kidney BBM, which is similar to the mass found for the transporter in pig erythrocytes [22]. This molecular mass is higher than those found in human erythrocytes (40–55 kDa) [23,34,36], Ehrlich ascites tumour cells (42 kDa) [25] and chromaffin cells (51 kDa) [37,38]. When the treatment of the samples was for 1 h at 37°C (Fig. 3B), further bands appeared which, according to their approximate molecular mass, probably correspond to dimers and tetramers of the 65 kDa form. The existence of dimers was suspected in human erythrocytes by radiation-inactivation studies performed by Jarvis et al. [39] and found in chromaffin cells by SDS-PAGE [37,38]. The physiological significance of the existence of dimers and tetramers requires further investigation but, based on the conditions required for their appearance (37°C, 1 h), they may involve hydrophobic interactions.

It should be noted that the chromatographic behaviour of the NBTI-sensitive nucleoside transporter from pig kidney BBM is very interesting if compared with that of human and pig erythrocytes. Under similar conditions as those used in this paper, and with DEAE cellulose, the transporter from pig erythrocytes eluted in the 80–110 mM NaCl range [21]. In contrast, the behaviour of the transporter from pig kidney BBM (Fig. 6) and from human erythrocytes [19] upon passage through a DEAE-based column was identical, both eluting in the void volume. The difference in chromatographic behaviour between the transporter in two different locations (kidney and erythrocytes) of the same species (pig) may result from the existence of two different genes, two splicing products or from posttranscriptional modifications such as variation in the composition of the carbohydrates in the glycoprotein. According to the latter hypothesis, the removal of N-linked oligosaccharides by treatment with endoglycosidase F leads in both cases, kidney (Fig. 5) and erythrocytes [21], to a single band of 57 kDa. The composition of the carbohydrate side chains of the NBTI-sensitive nucleoside transporter seems to reflect specific expression patterns, since Hammond and Johnstone [25] have demonstrated that transporter molecules expressed in different cell types and which differ in molecular mass may lead to a single band of identical size upon removal of carbohydrates.

#### 5. Acknowledgements

This study was supported by Grants PB91-0263 from DGICYT, and 91-0272 from FIS-SS. Francisco Ciruela is recipient of a fellowship from the Program 'Formació d'Investigadors a Catalunya' from CIRIT (D.O.G.C. 23/11/1990). The authors are grateful to

Dr. Cembrano from Boehringer Ingelheim (Barcelona, Spain) for kindly providing dipyridamole. We thank Robin Rycroft from the 'Servei d'Assessorament Lingüístic de la Universitat de Barcelona' for the excellent technical assistance in the preparation of the manuscript. We acknowledge the technical guidance in the photolabelling techniques given by Dr. F. Trull, from the Department of Organic Chemistry of the University of Barcelona.

## 6. References

- [1] Osswald, H. (1983) in *Regulatory Function of Adenosine* (Berne, R.M., Rall, M.F. and Rubio, R., eds.), pp. 399–415, Martinus Nijhoff, Boston.
- [2] Spielman, W.S., Arend, L.J. and Forrest, J.N. (1987) in *Topics and Perspectives in Adenosine Research* (Gerlach, E. and Becker, B.F., eds.), pp. 249–260, Springer, Berlin.
- [3] Churchill, P.C. and Bidani, A.K. (1990) in *Adenosine and Adenosine Receptors* (Williams, M., ed.), pp. 335–380, Humana Press, Clifton, NJ.
- [4] Stone, T.W. and Simmonds, H.A. (1991) *Purines: Basic and Clinical Aspects*, pp. 158–167, Kluwer, Dordrecht.
- [5] Spielman, W.S. (1991) in *Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function* (Phillis, J.W., ed.), pp. 259–266, CRC Press, Boca Raton, FL.
- [6] Blanco, J., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1991) *Br. J. Pharmacol.* 107, 671–678.
- [7] Oliveira, A., Tomás, M. and López-Novoa, J.M. (1992) *Am. J. Physiol.* 262, C840–C844.
- [8] Blanco, J., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E.I. and Franco, R. (1990) *J. Cell. Physiol.* 143, 344–351.
- [9] Le Hir, M. and Dubach, U.C. (1984) *Pflügers. Arch.* 401, 58–63.
- [10] Trimble, M.E. and Coulson, R. (1984) *Am. J. Physiol.* 246, F794–F803.
- [11] Franco, R., Centelles, J.J. and Kinne, R.K.H. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1024, 241–248.
- [12] Gutierrez, M.M., Brett, C.M., Ott, R.J., Hui, A.C. and Giacomini, K.M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1105, 1–9.
- [13] Vijayalakshmi, D. and Belt, J.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 19419–19423.
- [14] Jarvis, S.M. (1988) in *Adenosine Receptors* (Cooper, D.M.F. and Londos, C., eds.), pp. 113–123, Alan R. Liss, New York.
- [15] Plagemann, P.G.W., Wohlhueter, R.M. and Woffendin, C. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 405–443.
- [16] Crawford, C.R., Ng, C.Y.C., Noel, L.D. and Belt, J.A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9732–9736.
- [17] Lee, C.W., Cheeseman, C.I. and Jarvis, S.M. (1990) *Am. J. Physiol.* 258, F1203–F1210.
- [18] Williams, A. and Jarvis, S.M. (1991) *Biochem. J.* 274, 27–33.
- [19] Jarvis, S.M. and Young, J.D. (1981) *Biochem. J.* 194, 331–339.
- [20] Tse, C.M., Belt, J.A., Jarvis, S.M., Patterson, A.R.P., Wu, J.S. and Young, J.D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3506–3511.
- [21] Kwong, F.Y.P., Baldwin, S.A., Scudder, P.R., Jarvis, S.M., Choy, M.Y.M. and Young, J.D. (1986) *Biochem. J.* 240, 349–356.
- [22] Kwong, F.Y.P., Tse, C.M., Jarvis, S.M., Choy, M.Y.M. and Young, D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 904, 105–116.
- [23] Kwong, F.Y.P., Davies, A., Tse, C.M., Young, J.D., Henderson, P.J.F. and Baldwin, S.A. (1988) *Biochem. J.* 255, 243–249.
- [24] Verma, A., Houston, M. and Marangos, P.J. (1985) *J. Neurochem.* 45, 596–603.
- [25] Hammond, R. and Johnstone, R.M. (1989) *Biochem. J.* 262, 109–118.
- [26] Vannier, C., Louvard, D., Maroux, S. and Desnuelle, P. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 185–199.
- [27] Lin, J.-T., Da Cruz, M.E.M., Riedel, S. and Kinne, R. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 640, 43–54.
- [28] Sorensen, K. and Brodbeck, U. (1986) *Experientia* 42, 161–162.
- [29] Casadó, V., Martí, T., Franco, R., Lluís, C., Mallol, J. and Canela, E.I. (1990) *Anal. Biochem.* 184, 117–123.
- [30] Casadó, V., Cantí, C., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1990) *J. Neurosci. Res.* 26, 461–473.
- [31] Stiles, G.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 10830–10843.
- [32] Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680–685.
- [33] Helmke, S.M. and Cooper, D.M.F. (1989) *Biochem. J.* 257, 413–418.
- [34] Jhun, B.H., Rampal, A.L., Berenski, C.J. and Jung, C.Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1028, 251–260.
- [35] Agbanyo, F.R., Vijayalakshmi, D., Craik, J.D., Gati, W.P., McAdams, D.P., Asakura, J., Robins, M.J., Paterson, A.R.P. and Cass, C.E. (1990) *Biochem. J.* 270, 605–614.
- [36] Kwong, F.Y.P., Fincham, H.F., Davies, F., Beaumont, N., Henderson, P.J.F., Young, J.D. and Baldwin, S.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21954–21960.
- [37] Torres, M., Delicado, E.G. and Miras-Portugal, M.T. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 969, 111–120.
- [38] Torres, M., Delicado, E.G., Fideu, M.D. and Miras-Portugal, M.T. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1105, 291–299.
- [39] Jarvis, S.M., Fincham, D.A., Ellory, J.C., Paterson, A.R.P. and Young, J.D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 772, 227–230.



**B.2. Regulation of the nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine uptake by cultured kidney cells.**

Juan Sayós, Julià Blanco, Francisco Ciruela, Enric I.Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís and Rafael Franco (1994).

*American Journal of Physiology* 257, F758-F766.



# Regulation of nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine uptake by cultured kidney cells

JOAN SAYÓS, JULIÀ BLANCO, FRANCISCO CIRUELA, ENRIC I. CANELA, JOSEFA MALLOL, CARMEN LLUIS, AND RAFAEL FRANCO

*Departament de Bioquímica i Fisiologia, Unitat de Bioquímica i Biologia Molecular A, Universitat de Barcelona, Barcelona 08028, Spain*

Sayós, Joan, Julià Blanco, Francisco Ciruela, Enric I. Canela, Josefa Mallol, Carmen Lluís, and Rafael Franco. Regulation of nitrobenzylthioinosine-sensitive adenosine uptake by cultured kidney cells. *Am. J. Physiol.* 257 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 36): F758–F766, 1994.—The effect of nitrobenzylthioinosine (NBTI) on [<sup>3</sup>H]adenosine uptake and the characterization of the [<sup>3</sup>H]NBTI binding in cell (primary cultures and LLC-PK<sub>1</sub> cell line) plasma membrane and brush-border membrane (BBM) vesicles from pig renal cortices and LLC-PK<sub>1</sub> cells was analyzed. [<sup>3</sup>H]adenosine uptake was strongly inhibited by NBTI in nonconfluent cells, whereas it was totally insensitive to the reagent in BBM. The concentration dependence of [<sup>3</sup>H]adenosine uptake in BBM was linear, suggesting simple diffusion. In both cell membranes and BBM high-affinity [<sup>3</sup>H]NBTI binding was observed. [<sup>3</sup>H]NBTI binding as well as NBTI-sensitive [<sup>3</sup>H]adenosine uptake was strongly reduced when cells grew to confluence. Both reduction effects were reproduced by treatment of nonconfluent cells with chlorophenyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP), which indicates that the transporter is regulated by a cAMP-dependent protein kinase. To confirm this hypothesis, the binding of [<sup>3</sup>H]NBTI was analyzed in pig kidney BBM obtained in the presence of orthovanadate and alkaline phosphatase. With respect to control membranes, BBM obtained in the presence of orthovanadate showed a lower maximum number of binding sites ( $B_{max}$ ), whereas those obtained in the presence of alkaline phosphatase showed a slight increase in  $B_{max}$  for [<sup>3</sup>H]NBTI binding. Taken together, these results suggest that the reduction in both [<sup>3</sup>H]NBTI-binding capacity and NBTI-sensitive [<sup>3</sup>H]adenosine uptake takes place by a mechanism that involves phosphorylation of the transporter molecule or of a protein that interacts with it.

transport regulation; hydrogen-3-labeled adenosine uptake; brush-border membranes; pig kidney; renal cell culture; nucleoside transport; adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase; phosphorylation

ADENOSINE, ACTING EXTRACELLULARLY exerts potent actions on a wide range of physiological systems, including the nervous, cardiovascular, gastrointestinal, urogenital, respiratory, and lymphatic systems. Many of these actions are mediated via specific receptors named P<sub>1</sub> purinoceptors. From studies on the variation of adenylate cyclase activity produced by adenosine analogues and of rank order potency of agonists, P<sub>1</sub> purinoceptors were classified into two classes: A<sub>1</sub>, which mediates decreases in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) levels and A<sub>2</sub>, which mediates increases in cAMP levels. It is now becoming clear that these two subtypes of adenosine receptors can be linked to a variety of signal transduction systems apart from that of adenylate cyclase. In the last two years, four subtypes of

the receptor (A<sub>1</sub>, A<sub>2a</sub>, A<sub>2b</sub>, A<sub>3</sub>) have been cloned from a variety of sources (see Ref. 32 for review).

The existence of A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and A<sub>3</sub> as well as a new subtype of adenosine receptor (5) in different anatomical zones of the kidney, indicates that a number of physiological effects of extracellular adenosine are mediated via specific receptors. However, the beneficial effects of adenosine and adenine nucleotides in the recovery of ATP levels after exposure to hypoxic conditions are mediated by adenosine transport and subsequent metabolism in kidney cells (4). For this reason, the study of nucleoside transporter systems in kidney becomes relevant. According to the nomenclature of Crawford and Belt (11) the different equilibrative (facilitated) nucleoside transporters in mammalian cells are denoted *es* for the nitrobenzylthioinosine (NBTI)-sensitive carrier and *ei* for the NBTI-insensitive carrier. [<sup>3</sup>H]NBTI is thus used as an affinity probe for the *es*-facilitated diffusion system (28). There are two different Na<sup>+</sup>-dependent (concentrative) transporters that differ from each other and from the equilibrative transporters in the substrate specificities. One (*cif*) accepts primarily purine nucleosides and the other (*cit*) primarily pyrimidine nucleosides.

The availability of renal cells in culture has led to the characterization of the transport in cells of a given lineage (1, 13, 16). In pig kidney cell lines (1, 16) as well as in opossum kidney cell lines (13), there is little or no Na<sup>+</sup>-dependent (concentrative) [<sup>3</sup>H]adenosine uptake, and the Na<sup>+</sup>-independent (equilibrative) uptake is strongly inhibited by NBTI, which correlates well with the existence of high-affinity [<sup>3</sup>H]NBTI-binding sites in the membranes of those cells.

Renal brush-border membranes (BBM) have also been a suitable model to study transport processes. There are several studies concerning the uptake of nucleosides, mainly adenosine and uridine, in BBM of renal (14, 22, 23), intestinal (18), and placental origin (2). In human placental syncytiotrophoblast BBM vesicles, Barros et al. (2) reported the existence of a high-affinity [<sup>3</sup>H]NBTI-binding site, which correlated with the inhibition of the adenosine uptake by NBTI; the NBTI-insensitive component of the uptake was linear, thus representing simple diffusion. In rat renal BBM, the adenosine transporter has at least two saturable components, one Na<sup>+</sup>-independent and another Na<sup>+</sup>-dependent (14, 22, 23). In the presence of inwardly directed gradients of Na<sup>+</sup>, a transient overshoot is obtained, which indicates active transport. On the other hand, the Na<sup>+</sup>-independent component is NBTI insensitive (14). Heterogeneity of the Na<sup>+</sup>-independent nucleoside transporters with respect to their sensitivity toward

NBTI and their capacity to bind [ $^3\text{H}$ ]NBTI and other high-affinity probes ([ $^3\text{H}$ ]dipyridamole, for instance) have been described in different systems (17, 19). However, the explanation for the existence of such heterogeneity remains elusive. Recent immunological studies (20) confirm that, despite their differences in sensitivity toward inhibitors such as dipyridamole or dilazep, the mammalian NBTI-sensitive species are related in amino acid sequence.

In this paper, we characterize the [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding and the  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in renal cells as well as in BBM derived from pig kidney and from cultured LLC-PK<sub>1</sub> cells. For cells, it is demonstrated that there is a regulation of the facilitated nucleoside transporter by a cAMP-dependent protein kinase. This kinase phosphorylates the molecule to give a nonfunctional transporter that binds little [ $^3\text{H}$ ]NBTI with low affinity. In the case of BBM, it results that there are high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI sites present in these membranes but that the  $\text{Na}^+$ -independent adenosine uptake is due to simple diffusion.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cell cultures.** LLC-PK<sub>1</sub> pig kidney epithelial cells were provided by Dr. Rolf Kinne (Max Planck Institut für Molekularphysiologie, Dortmund, Germany). Cells were cultured (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Whittaker, Walkersville, NY) supplemented with 5% (vol/vol) fetal calf serum (GIBCO, Grand Island, NY), 1% nonessential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 0.5 mM 2-mercaptoethanol. For uptake and binding experiments, cells were seeded on 35-mm tissue culture dishes at  $10^5$  cells/dish in 2 ml of complete medium. The cells were given fresh medium every other day and were used, unless otherwise stated, between the third and the fifth day (subconfluence).

**Primary cultures from pig kidney cortex.** Pig kidneys were obtained from the local slaughterhouse immediately after the death of the animals and transported to the laboratory in cold 250 mM sucrose, 10 mM triethanolamine buffer, pH 7.4. Kidneys were then perfused with 100 ml of DMEM and 100 ml of an enzyme solution (collagenase 0.4 g and hyaluronidase 0.5 g in 200 ml of DMEM). Ten grams of the perfused kidney cortex were dissected and incubated at 37°C, for 1 h, in 100 ml of the same enzyme solution with continuous oxygenation (95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$ ). The final mixture was filtered, allowed to stand for 10 min at 4°C and then centrifuged at 2,000  $g$  for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in DMEM and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS; Sigma Química, Madrid, Spain), pH 7.4. The final pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin, 1% streptomycin, and 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amphotericin B (all reagents from GIBCO). The suspension was poured into collagen-coated 35 mm petri dishes, and cells were grown (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) for up to 7 days. The number of epithelial cells and of fibroblasts were counted in 10 different fields for each plate. Plates containing > 5% fibroblasts were discarded.

**Preparation of luminal membranes from pig kidney proximal tubules.** Luminal membranes (BBM) were isolated by a magnesium precipitation method described by Lin et al. (24). The final pellet (BBM) was suspended in 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)·HCl buffer, pH 7.5, to a final protein concentration of 20–30 mg/ml. Membrane suspensions were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . In the final membrane fraction, the marker enzyme alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) was

enriched 9- to 11-fold. As previously stated (24), luminal membrane vesicles were > 85% right-side out and essentially composed of sealed vesicles. Where indicated, BBM were obtained in the presence of a cocktail of protease inhibitors composed of 1  $\mu\text{M}$  leupeptin, pepstatin, aprotinin, and bestatin, 200  $\mu\text{M}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 100  $\mu\text{M}$  EDTA (Sigma Química, except PMSF from Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain). In one set of experiments, BBM were obtained in the presence of either 1 mM orthovanadate (Sigma Química) or 1 U/ml alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim) (see RESULTS). These compounds were included in all solutions during the isolation of BBM.

**Preparation of apical membrane vesicles from LLC-PK<sub>1</sub> cell line.** LLC-PK<sub>1</sub> cells were grown in roller bottles in order to obtain a large quantity. Apical membrane vesicles were prepared by the method described by Biber et al. (3). These vesicles correspond to BBMs and thus the abbreviation BBM will be used throughout in this paper to refer to them. In the final membrane fraction, the marker enzyme alkaline phosphatase was enriched five- to sevenfold.

**Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine.** For primary cultures and LLC-PK<sub>1</sub> cells uptake measurement, the culture medium was aspirated from the dishes, and cells were rinsed three times in 1 ml of warm sodium-free Hanks' balanced salt solution (sodium-free HBSS, in mM: 138 choline chloride, 1.3 KCl, 1  $\text{Ca}_2\text{Cl}$ , 4  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , 0.3  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) buffered to pH 7.4 with 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES). Cells were preincubated (15 min at 37°C, unless otherwise stated) with 900  $\mu\text{l}$  of the same medium containing 0.1  $\mu\text{M}$  deoxycoformycin (Sigma Química) as adenosine deaminase inhibitor, with or without NBTI (from Sigma Química). Uptake (measured in triplicate) was initiated by the addition of 100  $\mu\text{l}$  of [ $^3\text{H}$ ]adenosine (New England Nuclear Research Products, Boston, MA) in the same medium. Uptake was terminated by aspirating the solution and rapidly rinsing the dishes three times in ice-cold medium. Cultures were then soaked and solubilized with 1 ml of 0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS; Boehringer Mannheim). To these extracts, 10 ml of Formula-989 liquid scintillation cocktail (New England Nuclear Research Products) were added. After at least 12 h of continuous shaking, the vials were counted in a Packard 1600 Tri-Carb liquid scintillation counter with an efficiency of 50%. The results of uptake experiments were corrected for adhering extracellular medium by the method reported by Griffith et al. (16). The intracellular aqueous volume for LLC-PK<sub>1</sub> cells, determined from the distribution ratio at equilibrium (60 min) of nonmetabolized [ $^3\text{H}$ ]urea, whose transport was determined in the conditions described above, was estimated to be  $4.9 \pm 0.3 \mu\text{l}/\text{mg}$  protein. Calculations based on this value demonstrated that the intracellular adenosine concentration at 10 s of incubation with exogenous [ $^3\text{H}$ ]adenosine (see Fig. 1B) would be  $\sim 0.35 \mu\text{M}$ , i.e., slightly higher than the extracellular concentration used in the assays (0.25  $\mu\text{M}$ ). This indicates that even at 10 s there is some degree of metabolism of adenosine inside the cells and thus we are measuring uptake.<sup>1</sup>

Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine in BBM from pig kidney and LLC-PK<sub>1</sub> cells was measured in quintuplicate by a rapid filtration technique as described elsewhere (14).

The uptake data were corrected for the radioactivity remaining on the filter in the absence of membrane vesicles. To determine the [ $^3\text{H}$ ]adenosine bound to membranes, shrunken

<sup>1</sup> Uptake denotes the total intracellular accumulation of radioactivity from exogenous [ $^3\text{H}$ ]adenosine, regardless of metabolic conversions.

vesicles (having progressively less intravesicular volume) obtained by incubation of BBM (0.7 mg/ml) from both sources with increasing sucrose concentrations (0–800 mM) were assayed for [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake. The uptake varied linearly with 1 osmolarity and the extrapolated value at 1/osmolarity = 0, i.e., the radioligand bound to the membranes, was < 12% of the uptake in the absence of added sucrose and was subtracted in the given data. All media and solutions used were passed through Millipore filters (0.22  $\mu\text{m}$  pore size) immediately before use.

**[ $^3\text{H}$ ]NBTI binding assays in primary cultures and LLC-PK<sub>1</sub> cells.** For binding assays, the culture medium was aspirated from the dishes, and cells were rinsed three times in 1 ml of warm HBSS (in mM: 138 NaCl, 1.3 KCl, 1 Ca<sub>2</sub>Cl, 4 Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) buffered to pH 7.4 with 10 mM HEPES. Cells were preincubated (37°C, 30 min) in 1 ml of the same buffer containing 2 U/ml adenosine deaminase (Boehringer Mannheim). The medium was then aspirated and the cells were incubated (37°C, 30 min) with a solution of [ $^3\text{H}$ ]NBTI (New England Nuclear Research Products) prepared in the same medium. Free ligand was removed by aspirating the solution and rapidly rinsing the petri dishes three times in ice-cold medium. Cultures were then soaked and solubilized with 1 ml 0.2% SDS. Radioactivity was determined in a liquid scintillation counter after addition of 10 ml of Formula 989 cocktail, as described above. Nonspecific binding was determined in the presence of 2  $\mu\text{M}$  of unlabeled ligand.

**[ $^3\text{H}$ ]NBTI binding assays in BBM from pig kidney and LLC-PK<sub>1</sub> cells.** [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to intact BBM was measured after incubating the membranes (final protein concentration 0.7–0.8 mg protein/ml of suspension) with adenosine deaminase (0.2 U/ml) for 30 min at 25°C in 50 mM Tris·HCl buffer, pH 7.4. Radioligand and modulators or displacers were then added at variable concentrations (see RESULTS). After standing at 25°C until equilibrium was achieved (30 min), free and bound radioligand were separated by rapid filtration of 500- $\mu\text{l}$  aliquots through Whatman GF/C filters, which were subsequently washed with 10 ml of ice-cold Tris·HCl buffer. The filters were presoaked in 0.3% polyethylenimine (2–4 h, pH 10) to improve performance of the filtration. Nonspecific binding was determined in the presence of an excess (200- to 500-fold) of cold ligand. After filtration, the filters were placed in standard vials with 10 ml of liquid scintillation cocktail, and radioactivity was counted as described above. Absence of [ $^3\text{H}$ ]NBTI incorporation into BBM was demonstrated by the maintenance of 0.5 nM [ $^3\text{H}$ ]NBTI specific binding (0.23 pmol/mg protein) in shrunken vesicles obtained by increasing sucrose concentrations (see above; *Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine*).

**Photoaffinity labeling.** Membranes (0.7 mg protein/ml) were equilibrated in 50 mM Tris·HCl buffer, pH 7.4, with 5 nM [ $^3\text{H}$ ]NBTI in absence or presence of different competing nonradioactive ligands for 60 min at 25°C. Photoactivation was then carried out in 3-ml Perspex spectrophotometer cuvettes by 10-s exposure to a 200-W mercury lamp (Applied Photophysics) at a distance of 4 cm from the lamp housing. After irradiation, an excess (500-fold) of unlabeled NBTI was added and then allowed to stand at 25°C for 1 h before being filtered and washed with cold buffer to determine the covalently bound [ $^3\text{H}$ ]NBTI. Photolabeled membranes were collected by centrifugation at 60,000  $g$  for 1 h.

**SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).** Photolabeled membranes were washed once and dissolved in SDS-PAGE sample buffer: 125 mM Tris·HCl, 2% SDS, 20% glycerol (Boehringer Mannheim), 2% 2-mercaptoethanol (GIBCO), 0.002% bromophenol blue (Sigma Química), pH 6.8, and treated for 1 min at 100°C. The electrophoresis was performed

according to the method of Laemmli (21) using homogeneous slab gels containing 12.5% acrylamide separating gel, which were run at constant voltage. After running, the gel was fixed (10% acetic acid, 10% methanol, and 80% water) and dried at 80°C in a gel drier (Bio-Rad). Every lane in the dry gel was cut in 1.2-mm slices, which were dissolved with Solvable (New England Nuclear) for 3 h at 75°C, then 10 ml of liquid scintillation fluid were added, and radioactivity was counted as described above.

**Protein determination.** Protein was measured by the bicinchoninic acid (Pierce) method, as described Sorensen and Brodbeck (31).

**Data analysis.** Data from saturation isotherms and displacement and inhibition curves were fitted to the previously described equations (7, 8) and were analyzed by nonlinear regression using the Enzfitter program (Elsevier Biosoft) or other available programs as described elsewhere (7, 8). Three-to-five replicates of each point were performed. Goodness of fit was tested according to the reduced  $\chi^2$  or SD values given by the programs. By the modified *F*-test (see Ref. 7) it resulted, in all cases, that the fit to a two-component model was not significantly better than the fit to a one-component model.

## RESULTS

**Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine and [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding in primary cultures of pig cortical cells and in LLC-PK<sub>1</sub> cells.** Subconfluent primary cultures of cortical cells and subconfluent LLC-PK<sub>1</sub> cell cultures were assayed for Na<sup>+</sup>-independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in presence and absence of NBTI. The results (Fig. 1) show that the uptake was progressively inhibited by NBTI. In LLC-PK<sub>1</sub> cells, the inhibition curve reflected a single component (see MATERIALS AND METHODS). The half-maximal inhibition (IC<sub>50</sub>) value for NBTI is  $1.3 \pm 0.3$  nM. The NBTI-sensitive uptake as a percentage of total uptake was 94% in primary cultures and 85% in LLC-PK<sub>1</sub> cells; the remaining may correspond to the sum of passive diffusion, binding to adenosine receptors, and nonspecific interactions. Membranes of primary cultures of cells displayed a high-affinity component for [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding with a dissociation constant ( $K_d$ ) of  $0.8 \pm 0.2$  nM and maximum binding sites ( $B_{\text{max}}$ ) of  $0.29 \pm 0.02$  pmol/mg protein (Fig. 2A). The equilibrium parameters of the [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding were measured in intact subconfluent LLC-PK<sub>1</sub> cells, giving rise to the following values:  $K_d = 1.17 \pm 0.07$  nM and  $B_{\text{max}} = 0.30 \pm 0.01$  pmol/mg protein (Fig. 2B).

**Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine and [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding in BBM.** In experiments of [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake measured at different times (8–20 s), the presence of 10  $\mu\text{M}$  NBTI had no effect on the Na<sup>+</sup>-independent component of [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in pig BBM (Fig. 3A). Concentrations of NBTI in the range of 0–10  $\mu\text{M}$  did not affect the 10-s [ $^3\text{H}$ ]adenosine (2.5  $\mu\text{M}$ ) uptake. As indicated by the linearity of the plot shown in Fig. 4, adenosine uptake measured in pig kidney BBM did not appear to be saturable at concentrations of < 700  $\mu\text{M}$ .

The binding of [ $^3\text{H}$ ]NBTI to a fraction of BBM vesicles from pig kidney was assayed. The equilibrium binding isotherm shown in Fig. 2C indicates that the binding of [ $^3\text{H}$ ]NBTI represents the existence of high-affinity bind-

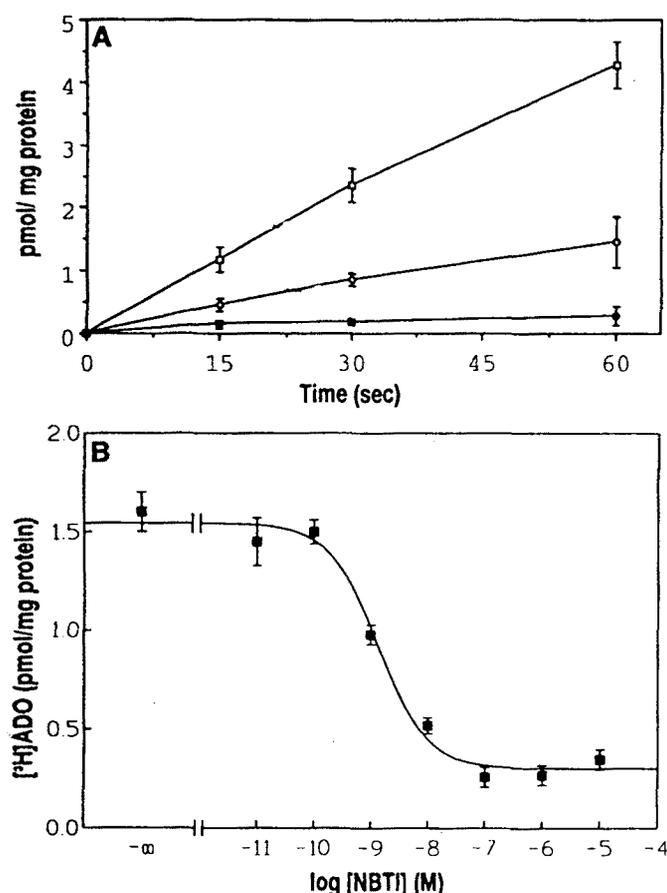


Fig. 1. Inhibition by nitrobenzylthioinosine (NBTI) of  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine (ADO) uptake in primary cultures of pig cortical cells (A) and in LLC-PK $_1$  cells (B). Cells were incubated with  $0.25 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]adenosine, in absence or presence of NBTI, as indicated in MATERIALS AND METHODS. In A, NBTI concentrations were 0 ( $\square$ ), 10 nM ( $\circ$ ), and  $1 \mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). In B, [ $^3\text{H}$ ]adenosine was incubated for 10 s, and half-maximal inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) value for NBTI was  $1.3 \pm 0.3 \text{ nM}$ . Values are means  $\pm$  SE derived from results of triplicate wells.

ing sites whose equilibrium parameter values are:  $K_d = 0.9 \pm 0.2 \text{ nM}$  and  $B_{\text{max}} 0.8 \pm 0.1 \text{ pmol/mg protein}$ . The affinity of pig renal BBM for [ $^3\text{H}$ ]NBTI was thus similar to that found in cells of primary cultures and LLC-PK $_1$  cells.

To confirm that [ $^3\text{H}$ ]NBTI was bound to the nucleoside transporter, we further characterized the specificity of the pig BBM-binding site. The displacement of the [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding by nucleosides and inhibitors of the transport and by adenosine receptor agonists was assayed in BBM from pig kidney. As shown in Table 1, the order of potency for adenosine transport inhibitors and analogues was: NBTI > dilazep > dipyrindamole  $\gg$  inosine  $\geq$  adenosine > uridine, whereas for adenosine-receptor agonists, the order of potency was: (*R*)-*N*<sup>6</sup>-(2-phenylisopropyl)adenosine = dipropylcyclopentyl xanthine = xanthine amine congener > 2-chloroadenosine > 5'-(*N*-ethylcarboxamido)adenosine = CGS-21680. The inhibition constant ( $K_i$ ) values (Table 1) indicate that the affinity of dipyrindamole and dilazep was in the nanomolar range.  $K_i$  values for  $A_1$ -adenosine receptor agonists are in the low micromolar range.  $K_i$  of

adenosine, inosine, and uridine, which share a common carrier, are in the high micromolar range as are the  $A_2$ -adenosine receptor agonists. The high  $K_i$  values found for glucose and cytochalasin B as well as the high affinity for [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding indicated that the NBTI-binding site does not correspond to the cytochalasin-sensitive glucose carrier.

For comparative purposes, adenosine uptake as well as NBTI binding was assayed in BBM derived from cultures of LLC-PK $_1$  cells that were grown to confluency. The absence of inhibition by NBTI of  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake (Fig. 3B) as well as the existence of high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites ( $K_d = 1.5 \pm 0.2 \text{ nM}$  and  $B_{\text{max}} = 0.82 \pm 0.03 \text{ pmol/mg protein}$ ) (Fig. 2D) were also found in this system. In BBM prepared from nonconfluent cells NBTI did not inhibit the 10-s  $0.25 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake (the uptake was  $0.05 \pm 0.01 \text{ pmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , in either absence or presence of  $10 \mu\text{M}$  NBTI). In these BBM from nonconfluent cells, the presence of high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites ( $K_d = 2.0 \pm 0.4 \text{ nM}$  and  $B_{\text{max}} = 0.7 \pm 0.2 \text{ pmol/mg protein}$ ) was also found.

*Photoaffinity labeling of [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites in cells and cell membranes.* To identify and partially characterize the NBTI-binding sites, [ $^3\text{H}$ ]NBTI was cross-linked to BBM from pig kidney and from LLC-PK $_1$  cells as well as to LLC-PK $_1$  cell membranes. Cross-linking was performed in BBM shortly after isolation (see MATERIALS AND METHODS). For LLC-PK $_1$  cell membranes, the cross-linking was performed in viable cultures of LLC-PK $_1$  cells from which membranes were subsequently isolated and processed as described in MATERIALS AND METHODS. As analyzed by SDS-PAGE, cross-linking of [ $^3\text{H}$ ]NBTI to membranes led, in all three samples, to the labeling of one single band of a molecular mass in the 62- to 65-kDa range (Fig. 5). This band corresponds to the nucleoside transporter and has been fully characterized (10). The molecular mass of the band corresponding to pig kidney BBM is high relative to that normally found in other mammalian sources (45–55 kDa) but is typical of the pig erythrocyte transporter (10). The molecular mass did not change when protease inhibitors (see MATERIALS AND METHODS) were included in all steps of the isolation procedure.

*Regulation of the transporter.* To attempt to explain why BBM from cells displaying both [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites and NBTI-sensitive adenosine uptake have [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites but do not have NBTI-sensitive uptake, experiments with LLC-PK $_1$  cells in different conditions of growth were performed.  $\text{Na}^+$ -independent adenosine uptake was measured in cells grown for 4, 6, 7, 10, and 13 days. Parallel experiments of [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to plasma membranes of these cells were carried out. Results presented in Table 2 indicate that the sensitivity of the transporter toward NBTI decreased within days after passage of cells. The decrease is a consequence of the apparent loss of NBTI-sensitive transporters due to a marked loss of affinity. Total uptake decreased drastically with days after passage of

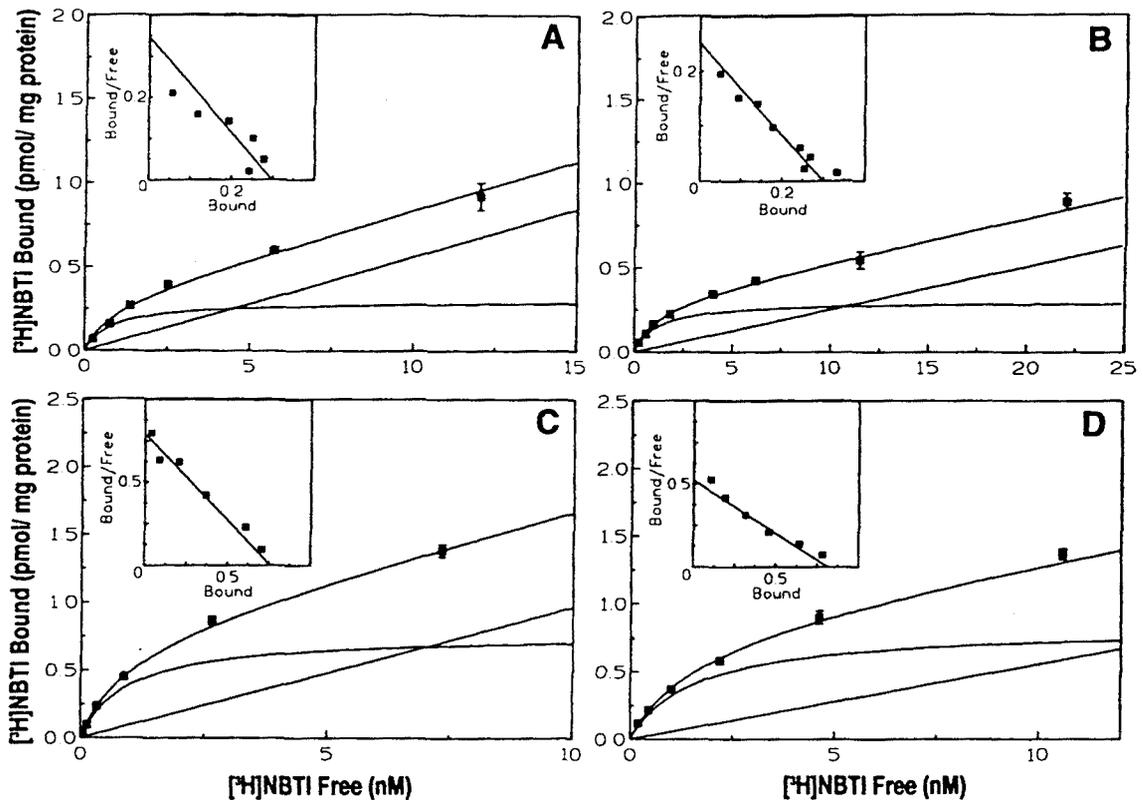


Fig. 2. Saturation isotherms of [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to primary cultures of pig cortical cells (A) and LLC-PK $_1$  cells (B) and to brush-border membrane (BBM) from pig kidney (C) and from LLC-PK $_1$  cells (D). Incubation procedure was as described in MATERIALS AND METHODS. All points represent means  $\pm$  SE of 5 replicates. Data were adjusted using nonlinear regression program. Computer-derived specific and nonspecific bindings are shown. Nonspecific binding derived coincided with that obtained experimentally in presence of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled NBTI. Insets: Scatchard plots of computer-derived specific binding data.

cells (from 0.34 at *day 4* to 0.09 pmol/mg protein at *day 13*), whereas the NBTI-independent uptake was similar in all cases (between 0.01 and 0.08 pmol/mg protein). It should be noted that the NBTI-sensitive component in confluent cells was very low (0.04 pmol/mg protein) compared with cells 4 days after splitting (0.31 pmol/mg protein).

The decrease in NBTI-sensitive uptake correlates well with a decrease in capacity and affinity of [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites (see Table 2). These results may be due to the disappearance of transporter molecules resulting from functional inactivation, decreased expression, or both. Due to the fact that BBM from confluent cells display a relatively high number of [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites (Fig. 2D), we favored the first hypothesis. To confirm the possibility that functional inactivation takes place by covalent modification, the uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine and the binding of [ $^3\text{H}$ ]NBTI were assayed in subconfluent cells (3 days after passage) treated with chlorophenyl-cAMP. Treatment of subconfluent cells displaying considerable NBTI-sensitive uptake and [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites with chlorophenyl-cAMP for 45 min led to a marked decrease in both [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake and [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding, as shown in Fig. 6. Because chlorophenyl-cAMP is an activator of protein kinases that depend on cAMP, it is assumed that phosphorylation of the transporter *in vivo* is the cause of

the concomitant decrease in nucleoside uptake and [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding. In similar experiments, phorbol esters did not modify either uptake or binding (data not shown). The detection of phosphate bound to the NBTI-binding molecule was attempted. The data were not conclusive because of technical problems derived from the fact that the amino acid sequence is not known and specific antipeptide antibodies cannot be raised, thus complicating the identification of the different molecular species.

If the hypothesis of the decrease of binding capacity and affinity by phosphorylation is true, the high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding, which is found in BBM (see above; *Equilibrative transport-mediated uptake of [ $^3\text{H}$ ]adenosine and [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding in BBM*), might result from a dephosphorylation during the isolation procedure. To confirm this idea, experiments of [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to BBM obtained in presence of orthovanadate, as nonspecific inhibitor of phosphatases, and alkaline phosphatase, as nonspecific phosphatase, were performed. Results presented in Table 3 indicate that prevention of dephosphorylation during isolation of BBM led to a significant decrease in [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding. The treatment with alkaline phosphatase led to a slight increase in [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding, which indicates that BBM obtained in the medium with no additives is found mainly in the dephosphorylated form.

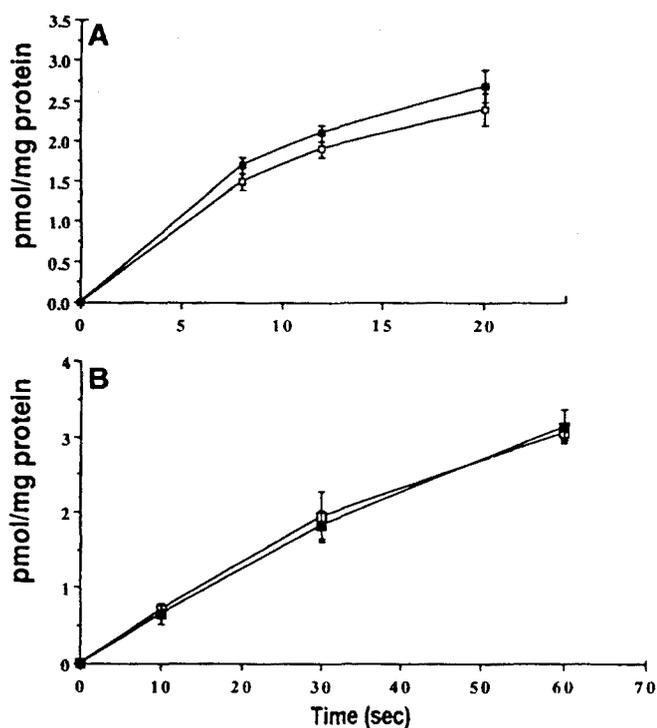


Fig. 3. Inhibition by NBTI of  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in BBM from pig kidney (A) and from confluent LLC-PK<sub>1</sub> cells (B). Time dependence of 2.5  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in absence (○) and in presence (●) of 10  $\mu\text{M}$  NBTI. Values are means  $\pm$  SD of a representative experiment in quintuplicates.

#### DISCUSSION

As summarized in Table 4, the existence of high affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding is consistent in all the membranes assayed in this paper, i.e., in membranes from subconfluent LLC-PK<sub>1</sub> cells and in BBM. The character-

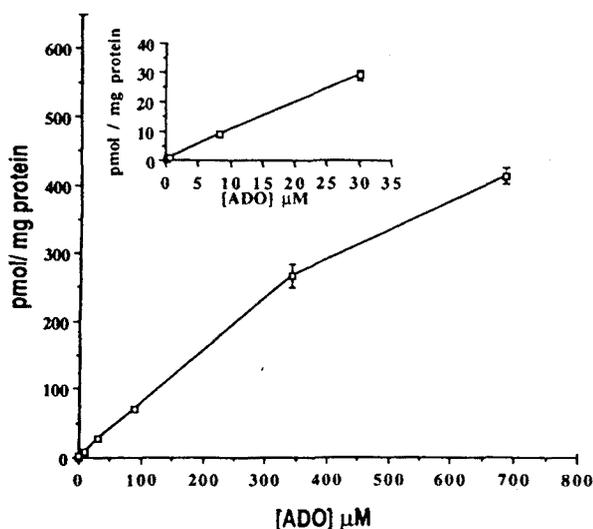


Fig. 4. Concentration dependence of  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake in BBM from pig kidney. [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake was measured as described in MATERIALS AND METHODS. All points represent means  $\pm$  SD of 5 replicates. Inset corresponds to curve at low adenosine concentrations (0.14–30  $\mu\text{M}$ ). Data fitted well to a straight line by nonlinear regression, and no significant improvement was obtained by fitting data to a model including a saturation curve.

Table 1. Inhibition constants for displacers of [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding to pig kidney BBM

Displacer	$K_i$ , $\mu\text{M}$
NBTI	0.0017 $\pm$ 0.0002
Dilazep	0.0047 $\pm$ 0.0007
Dipyridamole	0.0108 $\pm$ 0.0003
Inosine	100 $\pm$ 30
Adenosine	150 $\pm$ 50
Uridine	500 $\pm$ 80
Xanthine amine congener	8 $\pm$ 2
R-N <sup>6</sup> -(2-phenylisopropyl)adenosine	11 $\pm$ 1
Dipropylcyclopentyl xanthine	11 $\pm$ 2
2-chloroadenosine	70 $\pm$ 10
5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine	700 $\pm$ 200
CGS-21680	1,000 $\pm$ 800
Cytochalasin B	11 $\pm$ 2
Glucose	> 10 <sup>5</sup>

Values are means  $\pm$  SD and were calculated from half-maximum displacement ( $\text{IC}_{50}$ ) obtained by displacement of 1.2 nM [ $^3\text{H}$ ]nitrobenzylthioinosine ([ $^3\text{H}$ ]NBTI) binding by increasing concentrations of displacer (see MATERIALS AND METHODS).  $K_i$ , inhibition constant; BBM, brush-border membrane.

ization of this binding by the thermodynamic parameters ( $K_d$  and  $B_{\text{max}}$ ) and displacement curves indicates that the high-affinity binding sites indeed correspond to the equilibrative nucleoside transporter. In LLC-PK<sub>1</sub> cells and in primary cultures there is a correlation between [ $^3\text{H}$ ]NBTI binding and the inhibition by NBTI of the  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake (Table 4). This correlation is completely lost in BBM from either pig kidney or LLC-PK<sub>1</sub> cells (confluent or subconfluent) which exhibit high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites but without transporter-mediated uptake. Another interesting finding is the concomitant loss of  $\text{Na}^+$ -independent [ $^3\text{H}$ ]adenosine uptake and NBTI-binding sites in cells growing to confluence (Table 4). Because this effect can be mimicked by chlorophenyl-cAMP, it is likely that the carrier protein in these cells is regulated by phosphorylation. The phosphorylated transporter binds very little NBTI and transports very little adenosine. BBM from confluent cells, where the transporter is phosphorylated, display high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites (Table 4). Therefore, it can be assumed that the transporter is dephosphorylated during the isolation of BBM thus giving rise to the reappearance of [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites. What cannot be interpreted in terms of phosphorylation-dephosphorylation events is the fact that  $\text{Na}^+$ -independent adenosine uptake in BBM is not inhibited by NBTI. For these reasons, we will first discuss the lack of inhibition by NBTI of the nucleoside uptake in BBM and then the regulation by phosphorylation in vivo.

The NBTI binding in renal cells (primary cultures and LLC-PK<sub>1</sub> cells) correlates well with the NBTI inhibition of the  $\text{Na}^+$ -independent adenosine uptake. In contrast, in BBM from pig kidney or from LLC-PK<sub>1</sub> cells (Fig. 3) the effect of NBTI on  $\text{Na}^+$ -independent adenosine uptake is nil, thus giving rise to the apparent paradox of high-affinity [ $^3\text{H}$ ]NBTI-binding sites but no NBTI-sensitive adenosine uptake. A similar situation was reported by Gati et al. (15), who found that some Novikoff hepatoma cell lines possess high-affinity

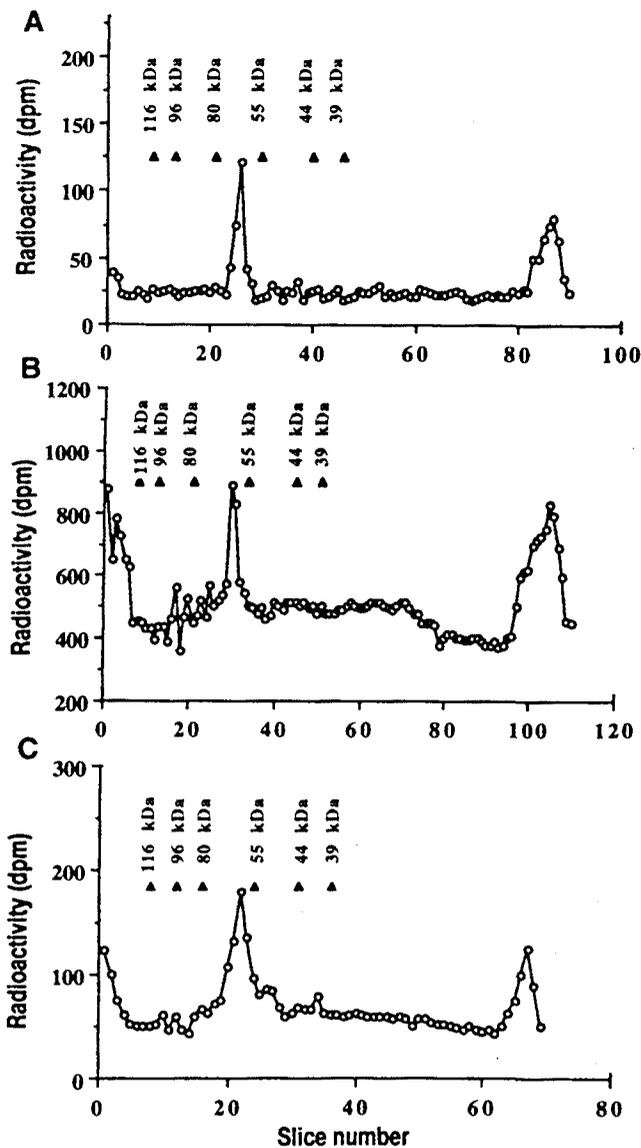


Fig. 5.  $[^3\text{H}]$ NBTI photoaffinity labeling to BBM from pig kidney (A) and LLC-PK<sub>1</sub> cells (B) and to LLC-PK<sub>1</sub> cell membranes (C). Membrane vesicles (0.7 mg protein/ml) were incubated in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, with 5 nM  $[^3\text{H}]$ NBTI. Samples were placed at 4 cm from lamp and exposed to UV light for 10 s. Membranes were washed with buffer to eliminate excess reagents and treated (1 min at 100°C) with sample buffer for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gel was run and dried as indicated in MATERIALS AND METHODS. Every lane in gel was cut into 1.2-mm slices, which were dissolved with Solvable for 3 h at 75°C, and radioactivity was counted in a liquid scintillation counter.

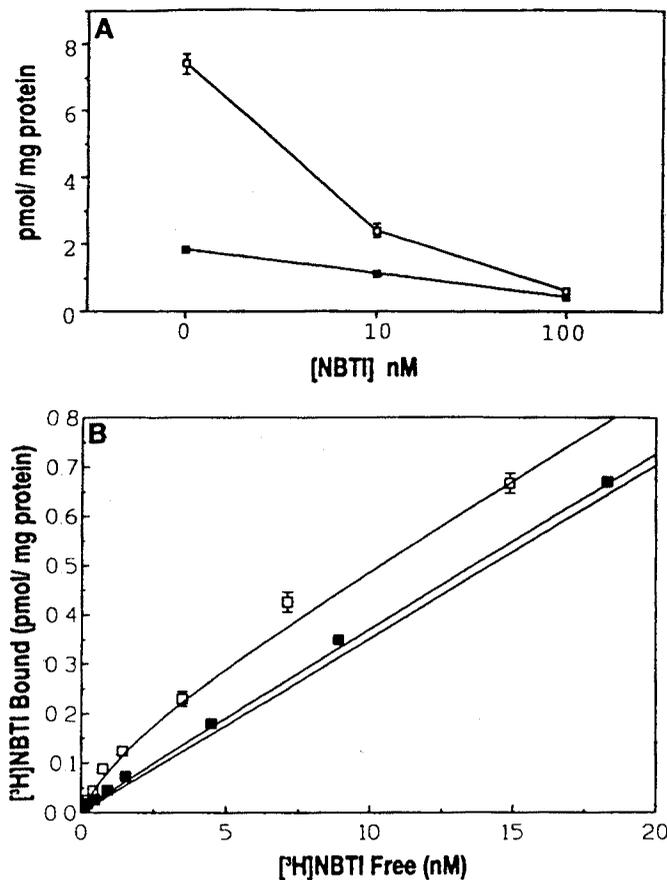


Fig. 6. Effect of chlorophenyl-cAMP on  $[^3\text{H}]$ adenosine uptake (A) and  $[^3\text{H}]$ NBTI binding (B) in LLC-PK<sub>1</sub> cells. Experiments were performed with subconfluent cells (3–4 days after splitting), which were incubated (37°C, 15 min) with 100  $\mu\text{M}$  chlorophenyl-cAMP in Na<sup>-</sup>-free buffered Hanks' balanced salt solution. Fresh medium with 100  $\mu\text{M}$  chlorophenyl-cAMP and NBTI was added for 30 min at 37°C.  $[^3\text{H}]$ adenosine uptake (0.25  $\mu\text{M}$ ) performed in fresh medium containing all additives was measured at 30 s as indicated in MATERIALS AND METHODS. Controls without chlorophenyl-cAMP and/or NBTI were done in parallel.  $[^3\text{H}]$ NBTI binding was characterized as indicated in legend of Fig. 3 in either naive or chlorophenyl-cAMP-treated (37°C, 45 min) cells. Nonspecific binding was same in both types of membranes. ■, Data for chlorophenyl-cAMP treated cells; □, data for cells not treated with chlorophenyl-cAMP. Values are means  $\pm$  SE derived from results of quintuplicate wells (A) or means  $\pm$  SE of 5 replicates (B).

$[^3\text{H}]$ NBTI-binding sites without expressing detectable NBTI-sensitive nucleoside uptake. One explanation, but one that we do not favor, is that the NBTI can no longer inhibit uptake, even though binding is maintained.

Table 2.  $[^3\text{H}]$ adenosine uptake and  $[^3\text{H}]$ NBTI binding during LLC-PK<sub>1</sub> cell growth

	Days After Common Cell Splitting				
	4	6	7	10	13
NBTI-sensitive $[^3\text{H}]$ adenosine uptake, pmol/mg protein	0.31 $\pm$ 0.04	0.35 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>†</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>†</sup>	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>†</sup>
$[^3\text{H}]$ NBTI binding $K_d$ , nM	0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	> 15	> 15
$B_{\text{max}}$ , pmol/mg protein	0.36 $\pm$ 0.09	0.29 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.06*	< 0.2 <sup>‡</sup>	< 0.2 <sup>‡</sup>

Values are means  $\pm$  SD.  $[^3\text{H}]$ adenosine uptake (0.25  $\mu\text{M}$ ) at 10 s was determined as described in MATERIALS AND METHODS in absence (control) or in presence of 1  $\mu\text{M}$  NBTI. Values are differences between uptake in absence and presence of NBTI.  $[^3\text{H}]$ NBTI binding isotherms were performed in cells as described in MATERIALS AND METHODS. Equilibrium binding parameters were obtained by fitting data by nonlinear regression program. \* $P < 0.05$ ; <sup>†</sup> $P < 0.005$ , with respect to controls at day 4; <sup>‡</sup>Specific binding at 1 nM  $[^3\text{H}]$ NBTI was < 10% of control.

Table 3. *Equilibrium parameters for [<sup>3</sup>H]NBTI binding to pig kidney BBM obtained in presence of 1 mM orthovanadate or 1 U/ml alkaline phosphatase*

	$K_d$ , nM	$B_{max}$ , pmol/mg protein
Control	1.1 ± 0.1	0.76 ± 0.02
Orthovanadate	1.1 ± 0.1	0.23 ± 0.01*
Alkaline phosphatase	0.96 ± 0.08	0.84 ± 0.02*

Values are means ± SD.  $K_d$ , dissociation constant;  $B_{max}$ , maximum number of binding sites. \* $P < 0.005$ .

Another explanation would be a change in the molecule of the transporter, which leads it to retain the NBTI binding but to lose the NBTI-sensitive adenosine uptake. This hypothesis would be supported by the high content of NBTI-binding sites in BBM (from either confluent or subconfluent cells) whose NBTI-sensitive facilitated transport is not observed. This molecular change is likely produced during the process of isolation of cell membranes but it does not seem to be due to degradation by proteases. In fact, the addition of protease inhibitors did not change the molecular mass of the [<sup>3</sup>H]NBTI-cross-linked transporter molecules analyzed by SDS-PAGE. However, a small change in the molecular mass of the transporter, not detectable by SDS-PAGE, cannot be ruled out. The plot shown in Fig. 4 indicates that [<sup>3</sup>H]adenosine uptake is not saturable at concentrations of < 700 μM; this would indicate that adenosine is entering the vesicles by simple diffusion. Although there is general agreement that cells depleted of ATP still display saturable adenosine transport, it has been recently described that ATP leads to increases of [<sup>3</sup>H]NBTI binding as well as enhances uridine transport in a non-hydrolysis-dependent fashion (9). The absence of ATP within BBM from pig kidney (29) might be the cause of the loss of transport; however, experiments of recovery of the specific nucleoside uptake in presence of ATP should be performed to confirm it. Unfortunately, such experiments are difficult to perform in BBM, since the level of ATPases, even in the interior of the vesicles, is very high (6, 29).

LLC-PK<sub>1</sub> cells growing to confluence showed a progressive decrease of both [<sup>3</sup>H]NBTI binding and NBTI-sensitive [<sup>3</sup>H]adenosine uptake. As shown in Table 2, the [<sup>3</sup>H]NBTI binding and the NBTI-sensitive adeno-

sine uptake is very low in confluent cells. This may be due to changes in expression or to a structural modification of the transporter molecule. The experiments performed in subconfluent LLC-PK<sub>1</sub> with chlorophenyl-cAMP suggest that a cAMP-dependent protein kinase phosphorylates the transporter. Regulation of the nucleoside transporter by phosphorylation-dephosphorylation was demonstrated by Miras-Portugal and co-workers (12, 26, 30) in chromaffin cells, by Nagy et al. (27) in S49 cells, and by Meckling-Gill and Cass (25) in *v-fps*-transformed fibroblasts. It should be noted that in our LLC-PK<sub>1</sub> cell preparations the phosphorylation of the transporter is not induced by phorbol esters (data not shown). This indicates that regulation of the nucleoside transporter in renal cells is through cAMP-dependent protein kinases but not through protein kinase C, as has been demonstrated in neural cells (11, 25). Phosphorylation of the transporter in Ser/Thr by cAMP-dependent protein kinases or protein kinase C leads to a loss of [<sup>3</sup>H]NBTI-binding capacity as well as a marked decrease in its carrier capacity (Fig. 6; Refs. 12, 26). The diminished capacity of confluent LLC-PK<sub>1</sub> cells to transport adenosine by the NBTI-sensitive transporter suggests that the NBTI-sensitive transporter in confluent cells is phosphorylated. This hypothesis is further sustained by the presence of high-affinity [<sup>3</sup>H]NBTI-binding capacity in BBM obtained from membranes of cells with negligible [<sup>3</sup>H]NBTI-binding capacity. This might be due to dephosphorylation of the transporter during the isolation of BBM that come from confluent cells either in culture (flasks of confluent LLC-PK<sub>1</sub> cells) or from renal tissue. This interpretation is supported by the experiments with pig kidney BBM performed in presence of orthovanadate and of alkaline phosphatase. Under the assumption that the transporter is dephosphorylated during the process of isolation of BBM, the presence of orthovanadate, a nonspecific inhibitor of phosphatases, would lead to decreases in [<sup>3</sup>H]NBTI binding, whereas dephosphorylation induced by alkaline phosphatase would lead to increases in [<sup>3</sup>H]NBTI binding. The results presented in Table 3 indeed demonstrate that renal BBM recover the specific [<sup>3</sup>H]NBTI binding by dephosphorylation. The finding of this phosphorylated, i.e., unable to transport and NBTI insensitive, form of the transporter that occurs in confluent cells may lead to

Table 4. *Summary of results concerning [<sup>3</sup>H]adenosine uptake and [<sup>3</sup>H]NBTI binding*

	Primary Cultures	BBM Source				
		LLC-PK <sub>1</sub> Cells		Pig kidney	LLC-PK <sub>1</sub> cells	
		Subconfluent	Confluent		Subconfluent	Confluent
<b>[<sup>3</sup>H]adenosine uptake, pmol · mg protein<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup></b>						
Control	0.075	0.03	0.009	0.2	0.05	0.07
NBTI-treated	0.005	0.003	0.005	0.2	0.05	0.07
<b>[<sup>3</sup>H]NBTI binding</b>						
$K_d$ , nM	0.8	0.7	> 15	0.9	2.0	1.5
$B_{max}$ , pmol/mg protein	0.29	0.36	< 0.2	0.8	0.7	0.82

[<sup>3</sup>H]adenosine (0.25 μM for cells and 2.5 μM for BBM) uptake at 10 s was determined as described in MATERIALS AND METHODS in absence (control) or in presence of 1 μM NBTI. [<sup>3</sup>H]NBTI binding isotherms were performed in cells as described in MATERIALS AND METHODS. Equilibrium binding parameters were obtained by fitting data by nonlinear regression program as described in MATERIAL AND METHODS.

## RESULTADOS 72

an important advance in the understanding of the physiological role of the uptake of nucleosides in cells.

The authors are grateful to Dr. Cembrano from Boehringer Ingelheim (Barcelona, Spain) for kindly providing dipyrindamole. We thank Robin Rycroft from the Servei d'Assessorament Lingüístic de la Universitat de Barcelona for the excellent technical assistance in the preparation of the manuscript. We acknowledge the technical guidance in the photolabeling techniques given by Dr. F. Trull, from the Department of Organic Chemistry of the University of Barcelona. We thank Catalina Relano from the Servei de Cultius Cellulars de la Facultat de Química for the technical assistance.

This study was supported by Grant 91-0272 from Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and Grant PB91-0263 from Dirección General de Investigación Científica y Técnica. F. Ciruela is the recipient of a fellowship from the Program Formació d'Investigadors a Catalunya from Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (DOGC 23/11/1990).

Address for reprint requests: R. Franco, Dept. of Biochemistry and Physiology, School of Chemistry, Martí i Franquès 1, Barcelona 08028, Catalonia, Spain.

Received 18 March 1994; accepted in final form 24 May 1994.

## REFERENCES

- Aran, J. M., and P. G. W. Plagemann. High-affinity, equilibrative nucleoside transporter of pig kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1108: 67-74, 1992.
- Barros, L. F., J. C. Bustamante, D. L. Yudilevich, and S. M. Jarvis. Adenosine transport and nitrobenzylthioinosine binding in human placental membrane vesicles from brush-border and basal sides of trophoblast. *J. Membr. Biol.* 119: 151-161, 1991.
- Biber, J., K. Malmström, S. Reshkin, and H. Murer. Phosphate transport in established renal epithelial cell lines. *Methods Enzymol.* 191: 494-505, 1990.
- Blanco, J., J. Mallol, C. Lluís, E. I. Canela, and R. Franco. Adenosine metabolism in kidney slices under normoxic conditions. *J. Cell. Physiol.* 143: 344-351, 1990.
- Blanco, J., E. I. Canela, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco. Characterization of adenosine receptors in brush-border membranes from pig kidney. *Br. J. Pharmacol.* 107: 671-678, 1992.
- Blanco, J., E. I. Canela, J. Sayós, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco. Adenine nucleotides and adenosine metabolism in pig kidney proximal tubule membranes. *J. Cell. Physiol.* 157: 77-83, 1993.
- 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.
- Casadó, V., M. T. Martí, R. Franco, C. Lluís, J. Mallol, and E. I. Canela. A method for binding parameters estimation of A<sub>1</sub> adenosine receptor subtype. A practical approach. *Anal. Biochem.* 184: 117-123, 1990.
- Casillas, T., E. G. Delicado, and M. T. Miras-Portugal. Adenosine-5'-triphosphate modulation of nitrobenzylthioinosine binding sites in plasma membranes of bovine chromaffin cells. *Neurosci. Lett.* 164:51-54, 1994.
- Ciruela, F., J. Blanco, E. I. Canela, C. Lluís, R. Franco, and J. Mallol. Solubilization and molecular characterization of the nitrobenzylthioinosine binding sites from pig kidney brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1191:94-102, 1994.
- Crawford, C. R., and J. A. Belt. Sodium-dependent, concentrative nucleoside transport in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 846-851, 1991.
- Delicado, E. G., R. P. Sen, and M. T. Miras-Portugal. Effects of phorbol esters and secretagogues on nitrobenzylthioinosine binding to nucleoside transporters and nucleoside uptake in cultured chromaffin cells. *Biochem. J.* 279: 651-655, 1991.
- Doherty, A. J., and S. M. Jarvis. Na<sup>+</sup>-dependent and -independent uridine uptake in an established renal epithelial cell line, OK, from the opossum kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1147: 214-222, 1993.
- Franco, R., J. J. Centelles, and R. K. H. Kinne. Further characterization of adenosine transport in renal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1024: 241-248, 1990.
- Gati, W. P., J. A. Belt, E. S. Jakobs, J. D. Young, S. M. Jarvis, and A. R. P. Paterson. Photoaffinity labelling of a nitrobenzylthioinosine-binding polypeptide from cultured Novikoff hepatoma cells. *Biochem. J.* 236: 665-670, 1986.
- Griffith, D. A., A. J. Doherty, and S. M. Jarvis. Nucleoside transport in cultured LLC-PK<sub>1</sub> epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* 1106: 303-310, 1992.
- Jarvis, S. M., and J. D. Young. Nucleoside transport in rat erythrocytes: two components with differences in sensitivity to inhibition by nitrobenzylthioinosine and *p*-chloromercuriphenyl sulfonate. *J. Membr. Biol.* 93: 1-10, 1986.
- Jarvis, S. M. Characterization of sodium-dependent nucleoside transport in rabbit intestinal brush-border membranes vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 979: 132-138, 1989.
- Jones, K. W., and J. R. Hammond. Heterogeneity of [<sup>3</sup>H]dipyridamole binding to CNS membranes: correlation with [<sup>3</sup>H]nitrobenzylthioinosine binding and [<sup>3</sup>H]uridine influx studies. *J. Neurochem.* 59: 1363-1371, 1992.
- Kwong, F. Y. P., H. E. Fincham, A. Davies, N. Beaumont, P. J. F. Henderson, J. D. Young, and S. A. Baldwin. Mammalian nitrobenzylthioinosine-sensitive nucleoside transport proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 21954-21960, 1992.
- Laemmli, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature Lond.* 227: 680-685, 1970.
- Le Hir, M., and U. C. Dubach. Sodium gradient-energized concentrative transport of adenosine in renal brush-border vesicles. *Pfluegers Arch.* 401: 58-63, 1984.
- Le Hir, M., and U. C. Dubach. Concentrative transport of purine nucleosides in brush border vesicles of the rat kidney. *Eur. J. Clin. Invest.* 15: 121-127, 1985.
- Lin, J.-T., M. E. M. Da Cruz, S. Riedel, and R. Kinne. Partial purification of kidney sodium-D-glucose cotransport system by affinity chromatography on a phlorytizin polymer. *Biochim. Biophys. Acta* 640: 43-54, 1981.
- Meckling-Gill, K. A., and C. E. Cass. Effects of transformation by v-fps on nucleoside transport in rat-2 fibroblasts. *Biochem. J.* 282: 147-154, 1992.
- Miras-Portugal, M. T., E. G. Delicado, T. Casillas, and R. P. Sen. Control of nucleoside transport in neural cells effect of protein kinase C activation. In: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man*, edited by R. A. Harkness. New York: Plenum, 1991, vol. VII, pt. A, p. 435-438.
- Nagy, L. E., I. Diamond, and A. S. Gordon. cAMP-dependent protein kinase regulates inhibition of adenosine transport by ethanol. *Mol. Pharmacol.* 40: 812-817, 1991.
- Paterson, A. R. P., E. S. Jakobs, C. Y. C. Ng, R. D. Odegard, and A. A. Adjei. Nucleoside transport inhibition in vitro and in vivo. In: *Topics and Perspectives in Adenosine Research*, edited by E. Gerlach and B. F. Becker. Berlin: Springer Verlag, 1987, p. 89-101.
- Sayós, J., C. Solsona, J. Mallol, C. Lluís, and R. Franco. Phosphorylation of adenosine in renal brush-border membrane vesicles by an exchange reaction catalyzed by adenosine kinase. *Biochem. J.* 297: 491-496, 1994.
- Sen, R. P., E. G. Delicado, and M. T. Miras-Portugal. Effect of forskolin and cyclic AMP analog on adenosine transport in cultured chromaffin cells. *Neurochem. Int.* 17: 523-528, 1990.
- Sorensen, K., and V. Brodbeck. A sensitive protein assay using micro-titer plates. *Experientia Basel* 42: 161-162, 1986.
- Tucker, A. L., and J. Linden. Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovasc. Res.* 27: 62-67, 1993.

