

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

MULTIFUNCIONALIDAD DE LA ADENOSINA DESAMINASA  
DE LA SUPERFICIE CELULAR Y DE SUS PROTEÍNAS DE  
UNIÓN

SILVIA GINÉS PADRÓS

## CAPÍTULO 4

### LA ADHESIÓN CELULAR ESTÁ REGULADA POR LA INTERACCIÓN ENTRE LA ADA DE SUPERFICIE PRESENTE EN CÉLULAS CACO-2 Y EL CD26 EXPRESADO EN LINFOCITOS T

La adenosina desaminasa (ADA), es un enzima implicado en el metabolismo purínico y presente en todos los tejidos de mamíferos teniendo un papel muy relevante en el desarrollo y función de las células linfoides (Kameoka et al, 1993; Martin et al, 1995; Valenzuela et al, 1997). En humanos, la deficiencia congénita de ADA causada por deleciones, defectos en el proceso de *splicing* o mutaciones puntuales en la región codificante del gen, conduce a una inmunodeficiencia severa combinada (SCID) caracterizada por alteraciones en la viabilidad y funcionalidad de los linfocitos T y B. Sin embargo, todavía no se han postulado mecanismos que puedan explicar las causas de esta inmunodeficiencia. Algunos autores consideran que la acumulación de sustratos de la ADA, adenosina y desoxiadenosina, no sería suficiente para explicar las causas de la SCID. Hay dos tipos de ADA, una intracelular y otra localizada a nivel de la superficie celular (ADA de superficie) (Aran et al, 1991; Dong et al, 1996). Mientras el ADA citosólica mantiene niveles no tóxicos de adenosina y desoxiadenosina, la ADA de superficie participa en el control de la concentración extracelular de los nucleósidos de adenina (Bellardinelli, 1993). Algunos de los efectos de la ADA de superficie, no están mediados por su actividad catalítica (Saura et al, 1996, 1998; Ciruela et al, 1996).

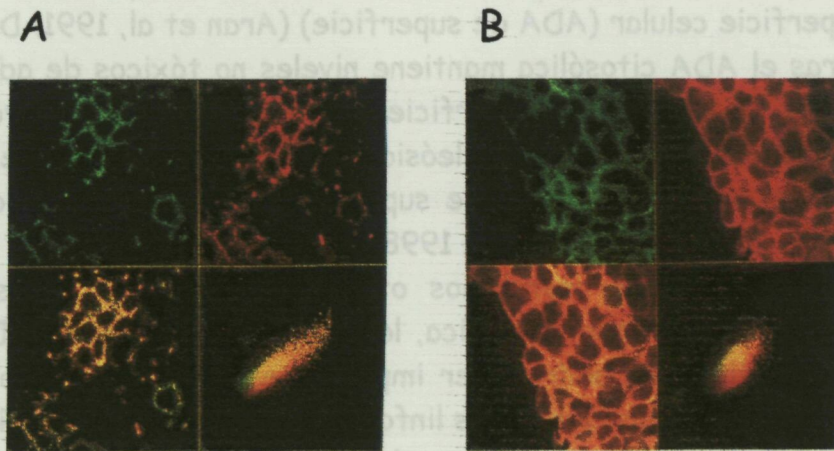
En este trabajo, nosotros postulamos otro papel del ADA de superficie independiente de su actividad catalítica, la participación de esta ADA en los contactos célula-célula que podrían ser importantes para el desarrollo de los tejidos linfoides y la maduración de los linfocitos (Fleisher et al, 1994).

El ADA intracelular es idéntica estructuralmente al ADA de superficie. El ADA es una proteína globular que necesita receptores específicos para poder anclarse en la membrana plasmática. El receptor de la ADA mejor caracterizado es el CD26. Sin embargo, un segundo receptor para la ADA, el receptor A<sub>1</sub> de adenosina ha sido descrito en células no linfoides (Saura et al, 1996). El CD26, es una proteína multifuncional de la membrana plasmática de 105-110kDa (Fleisher et al, 1994, 1995; Morrison et al, 1993; Torimoto et al, 1992) que presenta actividad dipeptidil peptidasa IV intrínseca (DPPIV) (Hegen et al, 1990). El CD26/DPPIV se expresa constitutivamente en distintos tipos celulares, mostrando una elevada expresión en los microvillis de las

células epiteliales de placenta, intestino y riñón (Yaron et al, 1993; Tirrupathi et al, 1990). En células T de sangre periférica, en las que no hay expresión del receptor  $A_1$  de adenosina, la expresión del CD26 está altamente regulada, y aumenta tras la activación de los linfocitos T (Fox et al, 1984; Fleisher et al, 1987). Por otro lado, el porcentaje de linfocitos T que expresan CD26 es muy superior al porcentaje de linfocitos T que expresan ADA de superficie, es decir, un gran número de moléculas de CD26 en la superficie de los linfocitos T no están unidas a ADA lo que constituye un *pool* de moléculas de CD26 libres. El objetivo de este estudio ha sido investigar si el ADA y el CD26 pueden participar en los contactos célula-célula. Para ello, se ha utilizado un sistema heterólogo formado por linfocitos T, que poseen moléculas libres de CD26, y células epiteliales que expresan una gran cantidad de ADA.

### 1-Expresión de ADA, CD26 y receptor $A_1$ de adenosina en células epiteliales CACO-2.

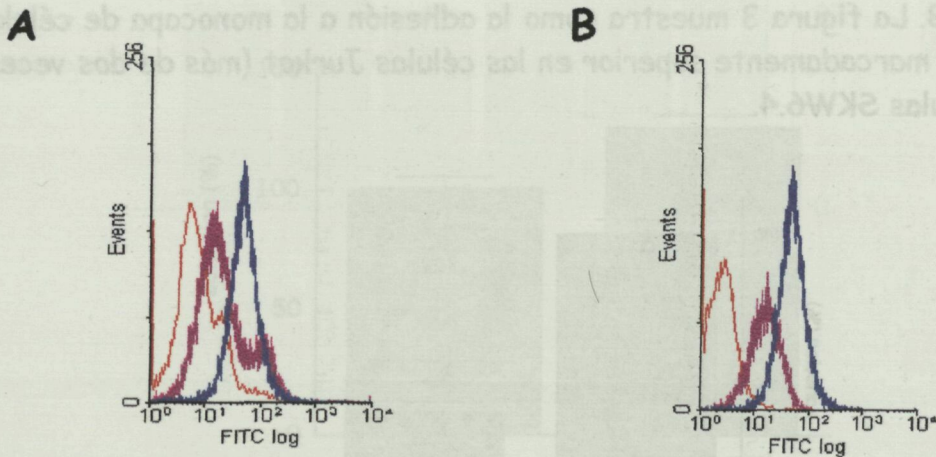
La expresión de ADA, CD26 y del receptor  $A_1$  de adenosina en células CACO-2 se ha estudiado mediante inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal (Materiales y métodos).



**Figura 1.** Panel A. Colocalización de la ADA y el CD26 en la membrana plasmática de las células epiteliales CACO-2. Las células se han tratado como se describe en materiales y métodos para ser analizadas por microscopía confocal marcándose con un anticuerpo anti-ADA conjugado con fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti-CD26 conjugado con rodamina (rojo). La imagen corresponde a una sección intermedia de las células. Barra de escala 10 $\mu$ m. Panel B. Colocalización de la ADA y el receptor  $A_1$  de adenosina en la membrana plasmática de las células CACO-2. Las células se han tratado como se describe en materiales y métodos para ser analizadas por microscopía confocal marcándose con un anticuerpo anti- $A_1R$  conjugado con fluoresceína (verde) y un anticuerpo anti-ADA conjugado con rodamina (rojo). La imagen corresponde a una sección intermedia de las células. Barra de escala 10 $\mu$ m.

Las células se han marcado bien con un anticuerpo anti-ADA conjugado a fluoresceína (anti-ADA-FITC) y con un anticuerpo anti-CD26 conjugado a rodamina (Ta1-RD) (Figura 1A) o bien con un anticuerpo anti-ADA conjugado a rodamina (anti-ADA-TRITC) y un anticuerpo anti- $A_1$  conjugado a fluoresceína (PC21-FITC) (Figura 1B). La observación de las muestras por microscopía confocal ha puesto de manifiesto una buena codistribución entre la ADA y el CD26 (Figura 1A). El hecho más remarcable es que pueden observarse algunas células que expresan ADA no colocalizada con CD26 y que aparecen en verde en la imagen de colocalización mostrada en la figura 1A. La figura 1B muestra una alta colocalización entre el receptor  $A_1$  de adenosina y la ADA (figura 1B). El receptor  $A_1$  colocaliza prácticamente de forma total con la ADA, sin embargo, hay moléculas de ADA no colocalizadas con el receptor de adenosina que aparecen en rojo o naranja fuerte en la imagen de colocalización. Estas moléculas, podrían corresponder a la ADA unida al CD26. Esto indica que probablemente en este sistema, tanto el receptor  $A_1$  de adenosina como el CD26 pueden actuar como moléculas de anclaje de la ADA.

## 2- Expresión de CD26 en células Jurkat y células CEM.

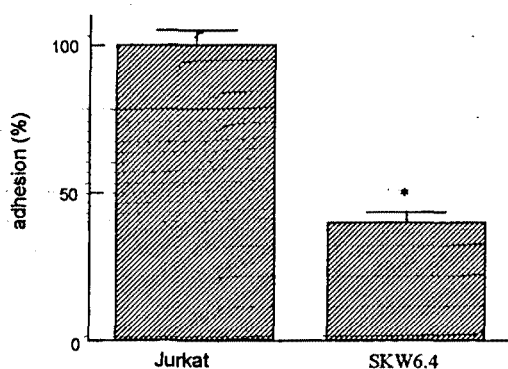


**Figura 2.** Expresión del CD26 en dos líneas linfocitarias (Jurkat y CEM) modificadas genéticamente. Las células se lavan con PBS, se fijan con paraformaldehído al 4 % en PBS y se tratan para su análisis por citometría de flujo como se describe en materiales y métodos marcándose con un anticuerpo anti-CD26 conjugado a fluoresceína. Panel A. Expresión del CD26 en células CEM<sup>NO1</sup> (violeta) y CEM<sup>LO2</sup> (azul). Panel B. Expresión del CD26 en células Jurkat (violeta) y Jurkat#11 (azul). En ambos casos el pico rojo corresponde al marcaje inespecífico.

La expresión de CD26 en la superficie de distintos clones de células CEM y en células Jurkat y Jurkat transfectadas establemente con el cDNA del CD26 humano (clon #11) se ha analizado por citometría de flujo (Materiales y métodos). Como se observa en la figura 2 la expresión es moderada en la línea parental (clone CEM<sup>NO1</sup> o Jurkat, línea violeta), mientras que la expresión en el clon de Jurkat #11 o en el clon CEM<sup>LO2</sup>, ambos cotransfectados con el cDNA del CD26 es elevada (línea azul).

### 3- Interacción de dos líneas celulares distintas (linfocitos T y B) con células CACO-2.

Como se ha puesto de manifiesto en apartados anteriores, las células CACO-2 expresan un porcentaje relativamente elevado de ADA de superficie ancorada a la membrana plasmática mediante el receptor A<sub>1</sub> de adenosina o el CD26. Por otro lado, las células linfoides expresan CD26 en su membrana con capacidad de unir ADA de superficie. Nuestro primer objetivo ha sido investigar que líneas celulares sanguíneas pueden interaccionar con las células CACO-2. Para ello monocapas confluentes de células CACO-2 se han incubado con dos líneas linfocitarias distintas: Jurkat, un modelo de linfocitos T y SKW6.4, un modelo de linfocitos B. La figura 3 muestra como la adhesión a la monocapa de células epiteliales, es marcadamente superior en las células Jurkat (más de dos veces) que en las células SKW6.4.



**Figura 3.** Adhesión de las células Jurkat y las células SKW6.4 a la monocapa de células epiteliales CACO-2. Células Jurkat marcadas con timidina tritiada se han incubado con una monocapa confluyente de células CACO durante 45 min a 37°C como se describe en materiales y métodos. Cada uno de los puntas se ha realizado por triplicado y los porcentajes que se muestran en la figura son la media de 4 experimentos diferentes  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.001$ .

Estos dos modelos celulares presentan diferencias significativas en la expresión de ADA y CD26 en la membrana celular, siendo del 100% en las células SKW6.4 para ambas moléculas mientras que para las células Jurkat es de un 40 % para el CD26 y de un 20-25% para la ADA (Martin et al, 1995). Es decir, en células Jurkat hay una marcada proporción de moléculas de CD26 "desocupadas", moléculas que no interaccionan con la ADA de superficie. Teniendo en cuenta todos estos datos, hemos hipotetizado que la adhesión entre linfocitos T y células epiteliales puede estar mediada, al menos en parte, por moléculas de CD26 "libres" expresadas en la superficie de los linfocitos T que interaccionarían con la ADA de superficie expresada en las células CACO-2. Para confirmar esta hipótesis, se ha estudiado el efecto de la ADA exógena en la adhesión de los linfocitos T a las células epiteliales.

#### 4- Papel de la ADA en la adhesión celular.

Los resultados descritos en el apartado anterior, sitúan a la ADA como posible candidata para modular la interacción CACO-2-Jurkat. Para investigar esta posibilidad, se ha incubado la monocapa de células CACO-2 con 10 µg/ml de ADA exógena durante 30 min, manteniéndose la proteína durante el ensayo de adhesión.

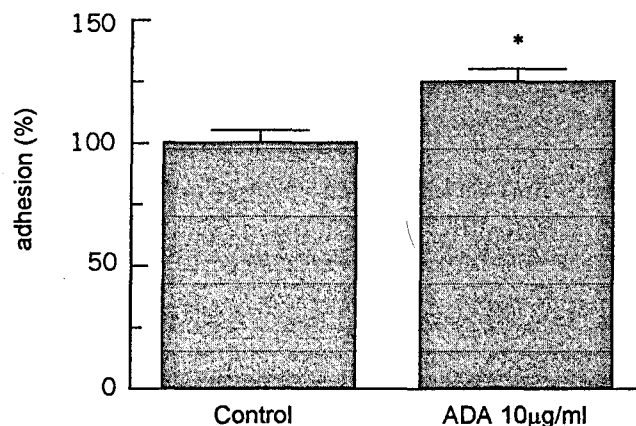
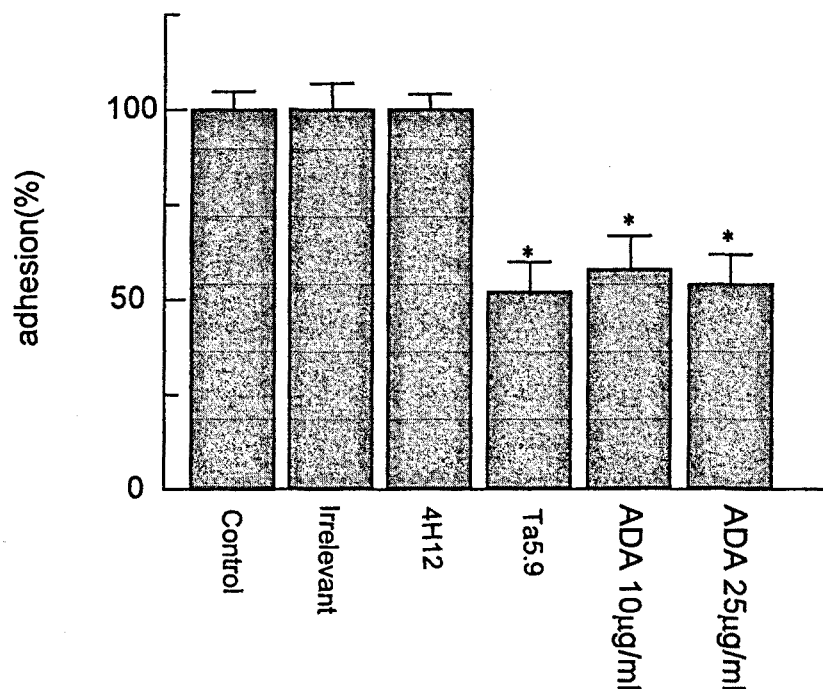


Figura 4. Papel de la ADA de las células CACO-2 en la adhesión célula-célula. La monocapa confluyente de células CACO-2 se incubó durante 30 min con ADA exógena. Tras la incubación se adicionan las células Jurkat marcadas radioactivamente. Después de 45 min la monocapa de células CACO-2 se lava para eliminar los linfocitos no adheridos y se disgregan con SDS 0.2%. La radioactividad se determina tal y como se describe en materiales y métodos. Cada uno de los puntos se ha realizado por triplicado y los porcentajes que se muestran en la figura son la media de 4 experimentos diferentes  $\pm$  s.e.m. \* $p \leq 0.05$

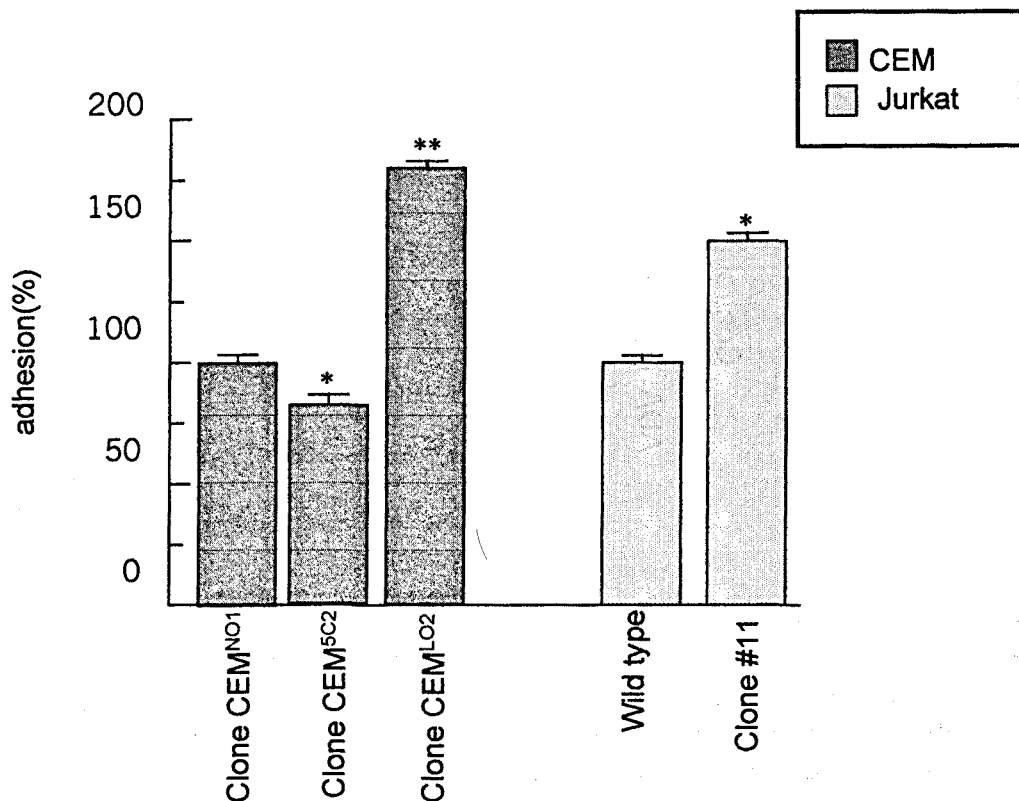
El resultado (Figura 4) indica que el aporte de ADA a las células CACO-2 incrementa de forma moderada el número de células Jurkat que se adhieren a la monocapa. Un experimento similar se hizo preincubando las células Jurkat con ADA (10 o 25  $\mu\text{g/ml}$ ) antes de llevar a cabo el ensayo de adhesión. En estas condiciones la ADA disminuye significativamente la adhesión (Figura 5). Un descenso similar se observa cuando las células Jurkat se preincuban con un anticuerpo monoclonal Ta5.9 dirigido contra el centro de unión de la ADA en el CD26 (Figura 5). La preincubación con un anticuerpo irrelevante o con un anticuerpo anti-CD26 (4H12) dirigido contra un epítipo distinto del de la unión de la ADA, no modifican la adhesión. Estos resultados sugieren que el ADA de superficie de las células epiteliales interacciona con el CD26 de las células T y que esta interacción puede regular la adhesión célula-célula.



**Figura 5.** Adhesión de las células Jurkat a la monocapa de células CACO-2 en presencia de ADA y de CD26. Las células Jurkat radiomarcadas se incuban en presencia de dos anticuerpos anti-CD26 distintos (4H12 y Ta 5.9 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) o con distintas concentraciones de ADA exógena (10 $\mu\text{g/ml}$  o 25 $\mu\text{g/ml}$ ) durante 30 min a 37°C tras lo cual se adicionan a la monocapa de células epiteliales incubándose durante 45 min a 37°C. La monocapa se lava para eliminar los linfocitos no adheridos y se disgregan con SDS 0.2%. La radioactividad se determina tal y como se describe en materiales y métodos. Cada uno de los puntos se ha realizado por triplicado y los porcentajes que se muestran en la figura son la media de 4 experimentos diferentes  $\pm$  s.e.m. \* $p \leq 0.01$

### 5- Papel del CD26 en la adhesión celular.

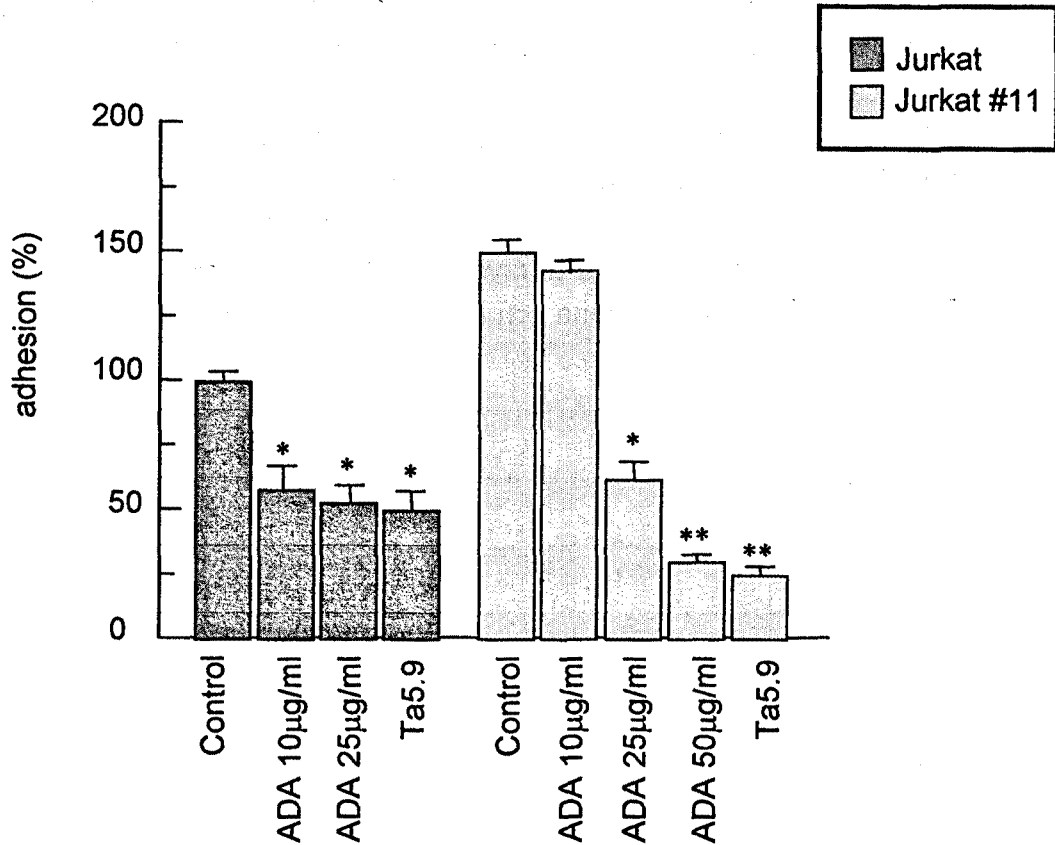
Con el fin de verificar que la adhesión de los linfocitos T a las células epiteliales depende del grado de expresión de CD26 "libre" en los linfocitos, se ha comparado la adhesión de la línea parental Jurkat y del clon #11 el cual sobreexpresa CD26. La adhesión del clon #11 es un 50 % superior a la adhesión de la línea parental (Figura 6). Un experimento similar se ha llevado a cabo con los distintos clones de las células CEM. La adhesión del clon CEM<sup>LO2</sup>, el cual expresa elevados niveles de CD26, es alta, mientras que es moderada tanto para el clon CEM<sup>NO1</sup>, que expresa niveles basales de CD26 como para el clon CEM<sup>5C2</sup> transfectado con un cDNA antisense del CD26 (Figura 6). Estos resultados indican claramente que el nivel de CD26 expresado en la superficie celular (Jurkat o CEM) correlaciona con la adhesión a células epiteliales.



**Figura 6.** Adhesión de las líneas celulares que sobreexpresan CD26 a la monocapa de células CACO-2. Los linfocitos marcados radioactivamente (Jurkat, Jurkat#11, CEM<sup>NO1</sup>, CEM<sup>LO2</sup>, CEM<sup>5C2</sup>) se incuban durante 45 min a 37°C con la monocapa de células epiteliales. La monocapa se lava para eliminar los linfocitos no adheridos y se disgregan con SDS 0.2%. La radioactividad se determina tal y como se describe en materiales y métodos. Cada uno de los puntos se ha realizado por triplicado y los porcentajes que se muestran en la figura son la media de 4 experimentos diferentes  $\pm$  s.e.m. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.001$ .



Como en el caso de las células parentales, la adhesión de las Jurkat #11 disminuye tras la preincubación con el anticuerpo Ta5.9 dirigido contra el centro de unión de la ADA en el CD26. A una concentración de 5µg/ml de anticuerpo, la adhesión se reduce un 52% en Jurkat parentales mientras que la reducción es muy superior (77%) para el clon #11 (Figura 7).

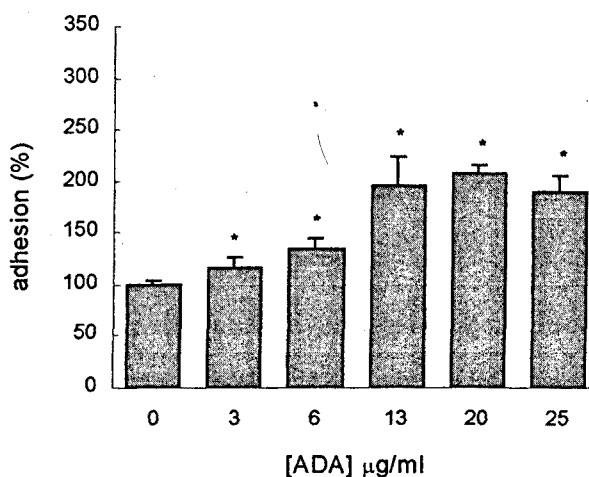


**Figura 7.** Adhesión de las células Jurkat y Jurkat#11 a la monocapa de células CACO-2 en presencia de ADA y de CD26. Las células Jurkat y Jurkat#11 radiomarcadas se incuban en presencia del anticuerpo anti-CD26 dirigido contra el centro de unión de la ADA (Ta 5.9; 5µg/ml) o con ADA exógena (10µg/ml, 25µg/ml o 50µg/ml) durante 30 min a 37°C tras lo cual se adicionan a la monocapa de células epiteliales incubándose durante 45 min a 37°C. La monocapa se lava para eliminar los linfocitos no adheridos y se disgregan con SDS 0.2%. La radioactividad se determina tal y como se describe en materiales y métodos. Cada uno de los puntos se ha realizado por triplicado y los porcentajes que se muestran en la figura son la media de 4 experimentos diferentes ± s.e.m. \*p≤0.01, \*\*p≤0.001.

Estos resultados vuelven a confirmar que la participación de la ADA/CD26 en la adhesión, incrementa en paralelo con la expresión de CD26 "libre" en las células T. Este hecho ha sido nuevamente confirmado por la drástica reducción de la adhesión de las células Jurkat #11 a las células CACO-2 cuando las células que sobreexpresan CD26 son incubadas con elevadas concentraciones de ADA exógena (10, 25 y 50 $\mu$ g/ml). La incubación con 25 $\mu$ g/ml de ADA conduce a una reducción de la adhesión del 83 % mientras que la máxima reducción de la adhesión inducida por preincubación con ADA exógena que se consigue en células parentales es tan sólo de un 50 % y no se han encontrado diferencias en células tratadas con 5 o 10  $\mu$ g/ml de ADA.

#### 5- Efecto de la ADA en la adhesión de células Jurkat a fibronectina. Implicación de las integrinas.

El CD26 es una proteína multifuncional que participa en múltiples interacciones, así, es capaz de interaccionar no tan sólo con la ADA como hemos visto en los apartados anteriores sino también con elementos de la matriz extracelular (Neubert et al, 1994, Onkubo et al, 1994), colágeno y fibronectina (Fleisher et al, 1994, Piazza et al, 1989). Puesto que el módulo ADA/CD26 hemos visto que puede modular la adhesión de los linfocitos T a células epiteliales, nos planteamos estudiar de que modo la ADA podía afectar la adhesión de los linfocitos a fibronectina en un modelo *in vitro*.

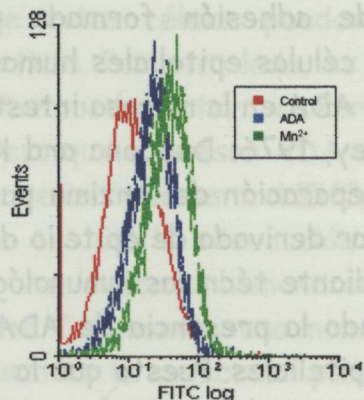


**Figura 8.** Adhesión de las células Jurkat a fibronectina. Células Jurkat ( $10^5$  células) se han incubado en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ADA en placas de 96 pozorcubiertas de fibronectina (materiales y métodos). El número absoluto de células adheridas se muestra como porcentaje de adhesión respecto a las células no tratadas.

Para ello, linfocitos T incubados con ADA exógena se adhirieron a una placa de fibronectina (Materiales y métodos). Los resultados mostrados en la figura 8 muestran que las células incubadas con ADA se adhieren más que las células no tratadas. El efecto de la ADA es además dosis-dependiente con un valor de  $EC_{50}$  de  $10 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ . La incubación de las células Jurkat con  $13 \mu\text{g/ml}$  o concentraciones superiores de ADA, dobla el número de células adheridas a las placas de fibronectina.

El efecto de la ADA en la adhesión de linfocitos a fibronectina puede estar mediado por la activación de integrinas, ya que es conocida la función de las VLA integrinas como receptores celulares de elementos de la matriz extracelular (Hynes et al, 1987; Hemler et al, 1990). Las integrinas pueden activarse por distintos mecanismos, la unión con sus ligandos o la preincubación con cationes divalentes como el  $Mn^{2+}$  o el  $Mg^{2+}$  (Dransfield et al, 1992; Arroyo et al, 1993; Masumoto et al, 1993a, b). Las integrinas activadas pueden ser detectadas por la expresión del epítipo HUTS-21 en la subunidad  $\beta 1$  (Luque et al, 1996). Nosotros hemos investigado si la interacción ADA/CD26 puede inducir la expresión del epítipo HUTS-21 en linfocitos T. Para ello, células Jurkat parentales y transfectadas (clon #11) y células CEM ( $CEM^{NO1}$ ,  $CEM^{LO2}$ ) se han preincubado con  $Mn^{2+}$  (control positivo), con ADA exógena o con tampón Hepes durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las integrinas activadas se han detectado usando un anticuerpo monoclonal anti-HUTS-21 y análisis por citometría de flujo. La incubación con  $Mn^{2+}$  conduce a un marcado incremento en la expresión del epítipo HUTS-21 en todas las células testadas. Cuando las células han sido preincubadas con ADA también se ha encontrado un marcado incremento en el porcentaje de células que expresan integrinas activadas (Figura 9A). En células parentales (Jurkat o  $CEM^{NO1}$ ) el máximo efecto (70-75% de células que expresan el epítipo HUTS-21) se consigue con  $10 \mu\text{g/ml}$  de ADA, mientras que es necesario concentraciones superiores de ADA para conseguir incrementos sustanciales en la activación de integrinas en los clones que sobreexpresan CD26 (Figura 9B). Ninguno de los estímulos utilizados, causa un incremento en los niveles de expresión de  $\beta 1$ , detectado por el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido contra integrinas generales (mAb LIA 1/2), indicando que los efectos del  $Mn^{2+}$  o la ADA se deben a cambios conformacionales de las integrinas y no a incrementos en la expresión.

**A**



**B**

| Stimuli          | %Cells labelled with HUTS-21 |           |         |         | %Cells labelled with LIA |           |         |         |
|------------------|------------------------------|-----------|---------|---------|--------------------------|-----------|---------|---------|
|                  | Jurkat                       | Jurkat#11 | CEM-NO1 | CEM-LO2 | Jurkat                   | Jurkat#11 | CEM-NO1 | CEM-LO2 |
| HEPES            | 42 ± 3                       | 28 ± 3    | 41 ± 3  | 41 ± 3  | 95 ± 8                   | 94 ± 8    | 95 ± 3  | 67 ± 3  |
| ADA 10µg/ml      | 75 ± 3                       | 30 ± 4    | 70 ± 3  | 49 ± 3  | 95 ± 10                  | 93 ± 9    | 70 ± 3  | 67 ± 5  |
| ADA 100µg/ml     | -                            | 60 ± 3    | -       | 60 ± 3  | -                        | 98 ± 9    | -       | 71 ± 3  |
| Mn <sup>2+</sup> | 96 ± 7                       | 81 ± 4    | 99 ± 7  | 99 ± 5  | 100 ± 10                 | 90 ± 10   | 96 ± 3  | 66 ± 3  |

**Figura 9.** Expresión del epítipo HUTS-21 de la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas de las células Jurkat. Panel A. Las células Jurkat #11 pretratadas con el tampón HEPES (control, representado en rojo) o con  $Mn^{2+}$  (1mM representado en azul) o ADA (100µg/ml) representado en verde) se marcan con el anticuerpo monoclonal HUTS-21 (Sanchez-Madrid et al, 1997) y se analizan por citometría de flujo como se describe en materiales y métodos. Panel B. El mismo tipo de experimento descrito en el panel A se ha realizado con distintas líneas celulares indicadas en la figura. Los resultados se han expresado como porcentaje de células que expresan el epítipo HUTS-21. Los valores representan la media  $\pm$  s.e.m de 4 experimentos independientes realizados por duplicado. El porcentaje de células que expresan  $\beta 1$  integrinas (activadas o no) se ha determinado usando el anticuerpo monoclonal anti-LIA1/2.

## DISCUSION.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar si el CD26 de la superficie celular puede funcionar gracias a su capacidad de unir la ADA de la membrana

plasmática como una molécula de adhesión. Con este propósito hemos utilizado un sistema heterólogo de adhesión formado por linfocitos humanos y monocapas confluentes de células epiteliales humanas (CACO-2). Es un hecho conocido que hay actividad ADA en la mucosa intestinal de numerosas especies (Van der Weyden and Kelley, 1976; Daddona and Kelley, 1978) siendo ésta la fuente habitual para la preparación del enzima purificado. Esto nos permitía suponer que una línea celular derivada de epitelio de colon humano presentaría ADA en su superficie. Mediante técnicas inmunológicas utilizando anticuerpos específicos, se ha observado la presencia de ADA ancorada en la membrana plasmática de las células epiteliales. Puesto que la ADA puede estar anclada a la superficie celular mediante dos proteínas (CD26 y el receptor  $A_1$  de adenosina) también mediante inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal se ha estudiado la expresión de estas dos moléculas en la superficie de las células CACO-2 y la codistribución con la ADA. Aunque entre la ADA y el CD26 se encuentra un buen nivel de codistribución, hay una cierta cantidad de células que expresan ADA no colocalizada con CD26. En estos caso la ADA tiene que estar unida a la membrana vía otra molécula receptora siendo el principal candidato el receptor  $A_1$  de adenosina. Estudiando la codistribución entre la ADA y el receptor  $A_1$  de adenosina se ha observado que prácticamente todo el receptor colocaliza con la ADA aunque también hay ADA libre que probablemente corresponde a la que colocaliza con el CD26. Teniendo en cuenta estos resultados, las células CACO-2 constituyen un modelo en el que hay cierto grado de diversidad en las proteínas que mantienen la ADA anclada en la membrana plasmática. Esto no es siempre así, en las células linfocitarias que no expresan el receptor  $A_1$  de adenosina, la ADA de superficie está mayoritariamente unida al CD26 (Kameoka et al, 1993; Morrison et al, 1993; De Meester et al, 1994). En sistemas celulares distintos del que aquí hemos estudiado, se sabe que la ADA de superficie de una forma independiente de su actividad catalítica, al interactuar con el receptor  $A_1$  de adenosina permite una mejor transducción de la señal a través de este receptor (Saura et al, 1996). En sistemas en los que la ADA interactúa con el CD26, como son los linfocitos T que no expresan receptor  $A_1$  de adenosina, la ADA de superficie también de una forma independiente de su actividad catalítica, actúa como coestimuladora de los linfocitos. Estas consideraciones ponen de manifiesto la diversidad funcional de esta proteína y hacen atractiva la hipótesis, base de este trabajo, de que si hay células que expresan ADA de superficie que pueden interactuar con células que expresan alguna de las proteínas que la unen a membrana plasmática, estas moléculas pueden intervenir en el proceso de

interacción célula-célula. La caracterización de las células CACO-2 descrita anteriormente muestra que estas células pueden actuar como modelo de expresión de ADA de superficie. Por otro lado, es un hecho conocido que las células epiteliales de intestino pueden interaccionar con linfocitos carentes de receptor  $A_1$  de adenosina pero que expresan ADA de superficie unida a CD26 (Springer et al, 1995; Oppenheimer-Marks and Ziff, 1988). Por tanto siguiendo los objetivos planteados, se estudió la interacción de células linfocitarias (la línea SKW6.4 derivada de una leucemia humana de tipo B y la línea celular Jurkat derivada de un linfoma T humano) a una monocapa de células epiteliales. Los linfocitos B, que expresan en la membrana plasmática moléculas de CD26 en su mayoría "ocupadas" por ADA, se adhieren menos que los linfocitos T en los que hay una cierta proporción de moléculas de CD26 "libres". En distintos clones de células T modificados genéticamente de manera que sobreexpresan CD26, se ha encontrado una buena correlación entre la expresión de CD26 "libre" y la adhesión a células CACO-2. Los clones que sobreexpresan CD26 (Jurkat#11 y CEM<sup>LO2</sup>) se adhieren mucho más que las líneas parentales (Jurkat y CEM<sup>NO1</sup>). Estos resultados indican que la contribución de la interacción ADA/CD26 en la adhesión entre células T y células epiteliales, depende de la proporción de CD26 "desocupado" expresado en la superficie de los linfocitos T. Desde un punto de vista fisiológico, parece que todos aquellos procesos que conducen a incrementar la expresión de CD26, como la activación de las células T (Martin et al, 1995), podría favorecer la interacción entre los linfocitos T y la ADA de superficie presente en distintos tipos celulares. La pérdida de adhesión tras la incubación de las células T con ADA exógena y los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-CD26 Ta5.9, dirigido contra el centro de unión de la ADA al CD26 en los que también se consigue una disminución en la adhesión, son indicativos de que el bloqueo del sitio de unión de la ADA al CD26 afecta la adhesión entre los linfocitos T y las células epiteliales. Es importante resaltar que la adhesión de células Jurkat que sobreexpresan CD26, se reduce en más de un 75% tras la incubación con ADA exógena o con el anticuerpo Ta5.9 es decir, bloqueando las moléculas de CD26 "libres" la adhesión disminuye. Todos estos resultados reafirman la hipótesis que la interacción ADA/CD26 es específica y tiene un papel relevante en la adhesión probablemente en los primeros contactos entre los linfocitos y las células epiteliales que derivarán en una adhesión célula-célula.

A nivel molecular, la contribución del módulo ADA/CD26 en la adhesión entre linfocitos y células CACO-2, está mediada por la unión de moléculas de CD26 "libre" y la ADA presente en la superficie celular de las células epiteliales

anclada a la membrana plasmática bien vía CD26 o bien vía el receptor A<sub>1</sub> de adenosina. Aunque no se conoce exactamente la estequiometría de la interacción ADA/CD26, se asume que el CD26 tiene un único sitio de unión a la ADA y que esta ADA es un monómero por lo que es muy probable que la ADA de las células CACO-2 que interacciona con los linfocitos esté anclada a membrana vía el receptor A<sub>1</sub> de adenosina. Esto sugiere un nuevo papel para el receptor A<sub>1</sub> de adenosina como molécula de anclaje capaz de presentar la ADA al CD26 en la superficie de células en contacto. Sin embargo, el receptor A<sub>1</sub> de adenosina por sí mismo no participa en los fenómenos de adhesión célula-célula, ya que la incubación de este receptor con el anticuerpo PC21 que reconoce el segundo bucle extracelular, no inhibe la adhesión de las células Jurkat incluso llega a aumentarla ligeramente (resultados no presentados) Puesto que el anticuerpo PC21 no es capaz de desplazar la unión de la ADA al receptor (Ciruela et al, 1996) una posibilidad es que los ligandos del receptor favorezcan la exposición de la ADA asociada a éste y sea únicamente la ADA de las células epiteliales la que intervenga en el proceso de adhesión. Este hecho se confirma al incubar las células CACO-2 con ADA exógena, saturando así todas las moléculas que puedan actuar como vehículo de anclaje de la ADA, induciendo de este modo un incremento en la adhesión de los linfocitos a la monocapa. Diversos estudios revelan que el sistema inmunológico puede afectar de forma relevante la función epitelial (Berin et al, 1999; Miura et al, 1998). La respuesta inmunológica aguda, media cambios en la fisiología epitelial que son beneficiosos para la defensa del organismo ante agentes patógenos. Los linfocitos pueden interaccionar con distintas moléculas de la superficie celular epitelial para ancorarse en el epitelio y ejercer ahí su función.

La adhesión entre diferentes tipos celulares es por tanto, un fenómeno complejo que requiere que una gran variedad de componentes de la matriz extracelular y proteínas de la superficie de las células entren en contacto. El reconocimiento ADA/CD26 *per se* no permite una eficiente adhesión entre los linfocitos y las células epiteliales, por ejemplo, la adhesión de células Jurkat a placas recubiertas con ADA no soporta los lavados necesarios para eliminar las células no unidas (resultados no presentados). Un probable escenario de la interacción linfocitos-células epiteliales sería la existencia de eventos tempranos o primarios mediados por la interacción ADA/CD26 que desencadenarían en linfocitos la activación de una vía de señalización que conduciría a la activación de lo que se han llamado propiamente moléculas de adhesión: integrinas. Nuestros resultados indican que el CD26 media la señalización vía la interacción ADA/CD26. La transducción de la señal conduce

a la activación de las integrinas (VLA) medida como la exposición del epítipo HUTS-21. La incubación de los linfocitos con ADA exógena activa las integrinas con una eficiencia similar a la del  $Mn^{2+}$  el cual se usa para la activación de las integrinas *in vitro*.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos hipotetizar que la ADA presente en la superficie de las células epiteliales interacciona con las moléculas de CD26 "libre" de la membrana plasmática de los linfocitos y esta interacción tiene un papel relevante en la adhesión célula-célula al permitir el cambio a la conformación activa de miembros de la familia de moléculas de adhesión como son las integrinas. Estos resultados son de especial interés ya que abren nuevas perspectivas en el estudio de cuales son las funciones fisiológicas de la ADA de superficie, tema este que constituye uno de los objetivos de nuestro grupo de investigación en el que se enmarca este trabajo.





## DISCUSSION



## DISCUSIÓN.

La adenosina desaminasa (ADA) es un enzima implicado en el metabolismo purínico y presente en todos los tejidos de mamíferos teniendo un papel relevante en la función y el desarrollo de los linfocitos (Kameoka et al, 1993; Martin et al, 1995; Valenzuela et al, 1997). La ADA es un enzima que se localiza tanto a nivel citosólico como en la superficie celular. Mientras la ADA citosólica mantiene a niveles no tóxicos la concentración de adenosina intracelular, la ADA de superficie puede ser considerada como una proteína multifuncional. Por un lado funciona como ecto-enzima controlando la concentración extracelular de nucleósidos de adenina (Bellardinelli 1993) y por otro y de una forma independiente de su actividad catalítica la ADA presenta un papel en la función del receptor  $A_1$  de adenosina. La ADA es necesaria para la identificación del estado de alta afinidad del receptor permitiendo de este modo que la transducción de la señal sea más eficiente, a su vez, la ADA está también implicada en el proceso de desensibilización del receptor acelerando el proceso de fosforilación e internalización (Ciruela et al, 1996, Saura et al, 1996, Saura et al, 1998). Entender las funciones fisiológicas de la ADA de superficie y estudiar la modulación entre proteínas expresadas en la membrana plasmática constituye uno de los objetivos centrales del grupo de investigación en el que se enmarca esta Tesis Doctoral.

El receptor  $A_1$  de adenosina pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas  $G$  (GPCR). La desensibilización inducida por agonistas como un mecanismo regulador de los GPCR ha sido bien caracterizada a nivel farmacológico y molecular pero poco se conoce acerca de las vesículas implicadas en la endocitosis de estos receptores, especialmente para el caso del receptor  $A_1$  de adenosina. La ruta principal de internalización descrita para los receptores acoplados a proteínas  $G$  es la vía endocítica clásica en la que participan las vesículas recubiertas de clatrina. Ruiz et al, en 1996 demostraron en cerebro de rata la implicación de vesículas de clatrina en la desensibilización del receptor  $A_1$  de adenosina. Tras el tratamiento "in vivo" con el agonista R-PIA, el receptor aparece de forma significativa en microsomas y vesículas revestidas. Sin embargo, son muchas las vesículas endocíticas descritas en la literatura por lo que no puede descartarse la participación de otro tipo de vesículas no revestidas de clatrina en el proceso de internalización de los GPCR. Algunos autores han demostrado la internalización de ciertos receptores acoplados a proteínas  $G$  vía vesículas no revestidas por ejemplo, el receptor muscarínico en fibroblastos humanos

internaliza vía una ruta independiente de clatrina (Raposo et al, 1987), este mismo receptor en miocitos tras la exposición a agonistas trasloca a caveolas (Feron et al, 1997). Por el contrario, en otras líneas celulares o en células transfectadas la internalización del receptor muscarínico o  $\beta$ -adrenérgico sigue la ruta clásica en la que participan vesículas de clatrina (Tolbert and Lameh, 1996; von Zastrow and Kobilka, 1992). Estos resultados han permitido sugerir un posible papel de las caveolas en los procesos de endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G.

Mediante experimentos de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti- $A_1R$  y anticuerpos anti-caveolina 1 hemos demostrado en células de túbulo proximal de riñón de cerdo (LLC-PK<sub>1</sub>) la codistribución tras el tratamiento con el agonista R-PIA del receptor de adenosina y la caveolina. El tratamiento con el agonista internaliza el receptor, localizándose tras 30 min de incubación en vesículas intracelulares en las que el grado de colocación entre el receptor y la caveolina es alto. La filipina, un compuesto que secuestra esteroides como es el colesterol, bloquea la internalización del receptor inducida por R-PIA al impedir la formación de las caveolas en cambio, el tratamiento con ácido acético que disminuye el pH citosólico impidiendo el ensamblaje de la clatrina, no impide la endocitosis del receptor. Estos resultados sugieren que la internalización del receptor  $A_1$  de adenosina ocurre por una ruta independiente de clatrina que implica caveolas.

Para el aislamiento de caveolas de las células renales LLC-PK<sub>1</sub> hemos utilizado protocolos de purificación libres de detergentes. El protocolo de aislamiento se basa en la disrupción de las células en un medio con carbonato sódico y la ultracentrifugación de las muestras en un gradiente de sacarosa. Utilizando estos protocolos hemos demostrado la translocación del receptor  $A_1$  de adenosina a caveolas tras la incubación con el agonista R-PIA. En células control la caveolina, principal proteína de las caveolas, aparece en las fracciones de baja densidad mientras que el receptor aparece distribuido en las fracciones de alta densidad. Sin embargo, tras la incubación 15 min con el agonista R-PIA el receptor de adenosina codistribuye en las mismas fracciones que la caveolina. Es decir, el agonista adenosínico R-PIA provoca la concentración del receptor  $A_1$  de adenosina en subdominios de la membrana plasmática ricos en caveolas. Recientemente Couet et al, 1998, han definido una región en las proteínas asociadas a las caveolas ( $\Phi X \Phi X X X X$  y  $\Phi X X X X \Phi X X \Phi$ , siendo  $\Phi$  un aminoácido aromático) que podría funcionar como dominio de unión a la caveolina. Este dominio (*caveolin binding motifs*) se ha identificado en el receptor EGF, PDGF, NGF (Liu et al, 1996, Mineo et al, 1996,

Corley-Mastick et al, 1995, Wu et al, 1997). El receptor  $A_1$  de adenosina en su cola citoplasmática presenta esta secuencia aminoacídica (YAFRIHKF) que podría comportarse como un dominio de unión a la caveolina.

Como hemos mencionado al principio de esta Discusión, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el receptor  $A_1$  de adenosina puede actuar como molécula de anclaje de la ADA en la superficie celular. Sin embargo, esta interacción ADA/ $A_1$ R no es pasiva, la ADA de un modo independiente de su actividad catalítica modula la función del receptor  $A_1$  de adenosina. En corteza cerebral de cerdo y en la línea celular de musculatura lisa de hámster DDT<sub>1</sub>MF-2 la ADA es capaz de modular la unión de los ligandos del receptor  $A_1$  así como la señalización a través del propio receptor. En este trabajo hemos demostrado mediante coimmunoprecipitación que en la línea renal LLC-PK<sub>1</sub> el receptor  $A_1$  de adenosina también se comporta como una proteína de unión de la ADA. Además, la ADA tras la incubación de las células con el agonista adenosínico R-PIA se internaliza conjuntamente con el receptor  $A_1$  de adenosina. Mediante inmunocitoquímica y análisis por microscopía electrónica hemos demostrado que ambas proteínas presentan el mismo patrón de marcaje y la misma cinética de internalización. Puesto que el receptor  $A_1$  de adenosina, según nuestros resultados, internaliza en estas células vía caveolas nos planteamos estudiar si existe también una colocalización entre la ADA y la caveolina. Los resultados obtenidos por microscopía confocal ponen de manifiesto que la incubación de las células con R-PIA induce la internalización de la ADA vía caveolas. Tras 30 min de incubación la ADA aparece en vesículas intracelulares en las que también se localiza la caveolina. Todos estos resultados suponen un avance importante en la comprensión de los mecanismos implicados en la endocitosis de los receptores acoplados a proteínas G y sugieren que el tipo de vesículas que conducen a la internalización del receptor tras la activación por sus ligandos, depende tanto del subtipo de receptor como del sistema celular en el que se exprese.

Por otro lado, estos resultados son un ejemplo de la co-modulación existente entre proteínas de la membrana plasmática. La interacción molecular entre el receptor  $A_1$  de adenosina y la ADA modula la transducción de la señal y la endocitosis del propio receptor. A principios de la década de los noventa Zoli et al, 1993 demostraron que las características de unión de un tipo de receptor acoplado a proteína G puede alterarse ante la estimulación de un tipo distinto de receptor también acoplado a proteína G. Esta modulación se ha postulado que tiene lugar a nivel de la transducción de la señal por ejemplo a nivel de segundos mensajeros o bien a otros niveles posteriores. Así, por ejemplo en el

sistema nervioso central y en especial en los ganglios basales se ha descrito un efecto antagonista entre los receptores de adenosina y los receptores de dopamina de modo que los receptores  $A_{2A}$  y  $A_1$  de adenosina modulan de forma antagónica los efectos producidos por la estimulación de los receptores  $D_2$  y  $D_1$  de dopamina respectivamente (Ferre et al, 1991, 1994, 1992, 1997). La demostración en nuestro grupo de investigación de que la modulación de distintos aspectos del receptor  $A_1$  de adenosina vía la ADA implica una interacción molecular entre ambas proteínas nos llevó a plantearnos si también los efectos antagonistas entre los receptores de adenosina y los de dopamina son debidos a una interacción molecular a nivel de membrana entre los dos receptores.

En fibroblastos de ratón cotransfectados con los cDNAs humanos de los receptores  $A_1$  de adenosina y  $D_1$  de dopamina (células  $A_1R/D_1R$ ) y en neuronas de córtex cerebral de rata hemos demostrado mediante coimmunoprecipitación, inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal la formación de heterómeros entre los receptores  $A_1$  de adenosina y los receptores  $D_1$  de dopamina. En células y en neuronas ambos receptores codistribuyen mostrando un grado de colocalización elevado. La asociación entre ambos receptores está modulada de forma diferencial por el agonista adenosínico R-PIA y el agonista dopaminérgico SKF-38393. En fibroblastos y en neuronas el agonista R-PIA es capaz de agregar ambos receptores. Es decir, el agonista R-PIA es capaz de inducir no tan sólo un cambio en la distribución del receptor de adenosina sino de modificar también la distribución del receptor de dopamina. Por el contrario, el agonista SKF-38393 induce en células  $A_1R/D_1R$  la agregación del receptor  $D_1$  de dopamina sin modificar la distribución del receptor de adenosina que presenta un marcaje homogéneo muy parecido al observado en las células control. El mismo agonista en neuronas corticales de rata induce la agregación de ambos receptores. En estos agregados formados tras la incubación con el agonista, el grado de colocalización entre ambos receptores es alto. Este diferente comportamiento de los receptores de adenosina en células  $A_1R/D_1R$  respecto a neuronas puede explicarse si consideramos que en un sistema artificial como son las células transfectadas pueden no estar presentes determinadas proteínas que sí se expresen en un sistema fisiológico como son las neuronas corticales de rata. Estos datos sugieren que los receptores  $A_1$  de adenosina y los receptores  $D_1$  de dopamina en respuesta al tratamiento con SKF-38393 podrían agregarse gracias a, o con, otros componentes todavía no identificados de la membrana plasmática. En este sentido, Brakeman et al, 1997 han identificado una

proteína del tipo PDZ (proteínas con dominios PDZ que se unen a los receptores de glutamato y a los canales iónicos) la proteína *Homer*, que se une en neuronas de forma específica a los receptores metabotrópicos de glutamato regulando la distribución y señalización a través de este receptor. Recientemente se han publicado datos que demuestran que los subtipos de receptores GABAérgicos GABA<sub>B</sub>R1 y GABA<sub>B</sub>R2 forman heterodímeros y que estos son imprescindibles para la formación del receptor GABA<sub>B</sub> funcional (Jones et al, 1998; Kaupmann et al, 1998; White et al, 1998). Todos estos datos sugieren la posibilidad de una interacción molecular entre subtipos de receptor A<sub>1</sub> de adenosina y subtipos de receptor D<sub>1</sub> de dopamina. Mediante técnicas de inmunoprecipitación hemos demostrado la coprecipitación del receptor A<sub>1</sub> de adenosina y el receptor D<sub>1</sub> de dopamina. En células A<sub>1</sub>R/D<sub>1</sub>R el anticuerpo anti-A<sub>1</sub>R es capaz de inmunoprecipitar el receptor D<sub>1</sub> de dopamina. En concordancia con los resultados obtenidos por microscopía confocal, el tratamiento con el agonista dopaminérgico SKF-38393 impide la coprecipitación del receptor D<sub>1</sub> de dopamina. Estos resultados sugieren que tras la incubación con el agonista se induce la agregación del receptor de dopamina sin modificar la distribución del receptor de adenosina y se disocian los heterómeros A<sub>1</sub>R/D<sub>1</sub>R. En estas condiciones el anticuerpo anti-A<sub>1</sub>R es incapaz de coprecipitar el receptor de dopamina. Por el contrario, el tratamiento con el agonista adenosínico R-PIA rinde una banda de 46kDa correspondiente al receptor D<sub>1</sub> de dopamina aunque la intensidad de esta banda es menor respecto a la obtenida en células control. La menor proporción de receptor de dopamina inmunoprecipitado tras la incubación con R-PIA, puede explicarse si tenemos en cuenta que el tratamiento con el agonista provoca la agregación del receptor de adenosina y de dopamina. En estos agregados de estequiometría desconocida es probable que los receptores A<sub>1</sub> de adenosina sean menos accesibles al anticuerpo inmunoprecipitante.

La estimulación del receptor D<sub>1</sub> de dopamina por sus ligandos activa la adenilato ciclasa aumentando los niveles del segundo mensajero AMPc. La desensibilización es un fenómeno propio de los receptores acoplados a proteínas G que se caracteriza por la atenuación de la respuesta celular tras exposiciones prolongadas o crónicas al agonista. En células A<sub>1</sub>R/D<sub>1</sub>R el pretratamiento con el agonista SKF-38393 (30, 60 o 120min) no desensibiliza el receptor D<sub>1</sub> de dopamina. Tras estos tiempos de incubación la activación del receptor por su ligando (SKF-38393, 10μM) induce la acumulación de AMPc. Puesto que el tratamiento con SKF-38393 induce la agregación del receptor estos resultados demuestran que el receptor agregado está acoplado



funcionalmente a la adenilato ciclaso transmitiendo eficientemente la señal de transducción. Del mismo modo el pretratamiento con R-PIA que también induce agregados del receptor  $D_1$  de dopamina no desensibiliza el receptor de dopamina. Sin embargo, el pretratamiento con ambos agonistas simultáneamente durante 60 o 120 min disminuye de forma significativa la acumulación de AMPc. Los resultados obtenidos por inmunocitoquímica demuestran que es precisamente el tratamiento simultáneo con ambos agonistas el que evita la agregación de ambos receptores. Ante estos resultados podemos hipotetizar que en los agregados inducidos bien por R-PIA bien por SKF-38393, el receptor  $D_1$  de dopamina es funcional. Tras la agregación, la exposición prolongada (15 min) a su ligando no lo desensibiliza. Por el contrario, la pérdida de la agregación tras la preincubación con ambos agonistas simultáneamente permite ante el mismo estímulo que el receptor se desacople de la adenilato ciclasa no señalizando eficientemente (desensibilización del receptor).

Tal y como hemos mencionado al inicio de esta Discusión uno de los objetivos del grupo de investigación y en particular de esta Tesis Doctoral es entender el papel multifuncional de la ADA de la superficie celular y de sus proteínas de unión. Nuestro grupo de investigación ya ha caracterizado un sistema en el que la ADA no funciona tan sólo como ecto-enzima sino como molécula moduladora de la funcionalidad del receptor  $A_1$  de adenosina. Saura et al, 1998 han definido un modelo de interacción de la ADA y el receptor  $A_1$  de adenosina según el cual esta interacción provoca un cambio conformacional del receptor de manera que la unión a sus ligandos es más efectiva, se favorece el acoplamiento con la proteína  $G_i$  y consecuentemente la transducción de la señal es más efectiva. Nuestros resultados han demostrado la formación de heterómeros  $A_1R/D_1R$ , por lo que se nos planteó la pregunta de cual sería el papel de la ADA de superficie en estos complejos. Nuestro primer objetivo ha sido caracterizar la distribución de la ADA en dichos heterómeros.

Mediante inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal hemos demostrado que en células  $A_1R/D_1R$  la ADA codistribuye con el receptor  $A_1$  de adenosina y con el receptor  $D_1$  de dopamina. Ante este resultado caben dos hipótesis, bien que la ADA esté unida a la membrana plasmática vía únicamente el receptor de  $A_1$  adenosina o bien vía este receptor y el receptor  $D_1$  de dopamina. La inmunocitoquímica en células  $D_1R$  (transfectadas únicamente con el receptor de dopamina) fijadas y con un anticuerpo anti-ADA-FITC nos da un marcaje negativo. La ADA no puede unirse a la superficie celular vía el receptor de dopamina en los complejos receptor-receptor es el receptor  $A_1$  de

adenosina el que funciona como molécula de unión de la ADA. El siguiente objetivo fue estudiar como afectaba la incubación con agonistas a la distribución de la ADA en los heterómeros A1R/D1R. Tras el tratamiento con el agonista adenosínico R-PIA que ya hemos visto induce la agregación del receptor A<sub>1</sub> de adenosina y el receptor D<sub>1</sub> de dopamina la ADA codistribuye con ambos. Estos datos sugieren que los agregados formados tras la incubación con el agonista están constituidos por las tres proteínas. Por el contrario, la incubación con el agonista dopaminérgico SKF-38393 agrega únicamente el receptor de dopamina. En estos agregados la ADA no está presente. Cuando estudiamos la distribución del receptor de adenosina en estas condiciones éste presenta una distribución homogénea que codistribuye con la ADA. La incubación simultánea con ambos agonistas no modifica la distribución respecto al control ni del receptor A<sub>1</sub>, ni del receptor D<sub>1</sub>, ni de la ADA.

Como hemos mencionado a lo largo de esta Tesis Doctoral, el receptor A1 de adenosina modula de forma antagónica el receptor D1 de dopamina. En presencia del agonista adenosínico CPA, disminuye la proporción de receptores de dopamina es estado de alta afinidad y consecuentemente la producción de AMPc. Puesto que la ADA es necesaria para identificar el estado de alta afinidad del receptor A1 de adenosina nos planteamos el papel de la ADA en la modulación de las características de unión del receptor D1 de dopamina. La incubación de las células A1R/D1R con desoxicoformicina (DCF) un inhibidor irreversible de la ADA que la desacopla vía un cambio conformacional del enzima del receptor de adenosina, el CPA a bajas (10 nM) o altas (10µM) concentraciones, no es capaz de modificar el binding del receptor D1 de dopamina. Estos resultados ponen de manifiesto que la ADA favoreciendo el estado de alta afinidad del receptor A<sub>1</sub> de adenosina modula de forma antagónica el receptor D<sub>1</sub> de dopamina.

Hasta el momento hemos descrito distintos papeles de la ADA de la superficie celular todos ellos relacionados con señales intracelulares producidas por la interacción de la ADA con una de sus proteínas de unión, el receptor A<sub>1</sub> de adenosina. La ADA a través de su otra proteína de unión el CD26 presenta además un papel en la comunicación intercelular. El CD26 es también una proteína multifuncional de la membrana plasmática que se expresa constitutivamente en muchos tipos celulares principalmente en células epiteliales de placenta, intestino y riñón (Yaron et al, 1993; Tirrupathi et al, 1990). En linfocitos T, que no expresan receptor A<sub>1</sub> de adenosina, la expresión del CD26 está altamente regulada aumentando tras la activación de los

linfocitos. La disposición de estas dos proteínas en la membrana plasmática y su capacidad de interactuar nos hizo plantear nuestro último objetivo. ¿Puede el sistema ADA/CD26 funcionar como un sistema de moléculas de adhesión? El sistema de adhesión escogido ha sido un sistema formado por linfocitos humanos T y monocapas confluentes de células epiteliales humanas, células CACO-2. Varias razones nos han llevado a esta elección. En primer lugar, el porcentaje de linfocitos T que expresan CD26 es muy superior al porcentaje que expresa ADA de superficie celular. Esto representa que un gran número de moléculas de CD26 de la membrana plasmática de los linfocitos T no está unida a ADA o lo que es lo mismo, nos encontramos ante un *pool* de moléculas de CD26 "libres" potencialmente capaces de unir ADA de otro sistema. En segundo lugar la mucosa intestinal se caracteriza por presentar una gran actividad ADA por ello una línea celular derivada de un adenocarcinoma de colon posiblemente presentaría abundante ADA en la superficie celular.

Mediante inmunocitoquímica y análisis por microscopía confocal hemos caracterizado la presencia de ADA, CD26 y receptor A<sub>1</sub> de adenosina en la membrana plasmática de las células CACO-2. Los resultados obtenidos demuestran que estas células representan un sistema en el que la ADA puede unirse a la membrana plasmática a través de las dos proteínas de unión clásicas, el receptor A<sub>1</sub> de adenosina y el CD26. El primer punto que abordamos fue estudiar que células linfocitarias eran capaces de unirse a una monocapa de células CACO-2. Para ello hemos testado dos tipos de linfocitos, la línea SKW6.4 derivada de una leucemia de tipo B y la línea Jurkat derivada de un linfoma T humano. La principal diferencia entre las dos líneas celulares radica en la expresión de CD26 y en la presencia de ADA en la superficie celular. Los linfocitos B expresan CD26 que en su mayor parte unen ADA mientras que los linfocitos T presentan una cierta proporción de moléculas de CD26 "libres". Los ensayos de adhesión han demostrado que los linfocitos T (células Jurkat) se adhieren más (~ 50%) que los linfocitos B. Este resultado sugiere la participación del CD26 en la adhesión linfocitos T/células epiteliales. Para confirmar esta hipótesis se han realizado otros ensayos de adhesión utilizando clones de la línea celular Jurkat y la línea celular CEM (timocitos humanos) transfectados con el cDNA del CD26. Ambos clones Jurkat #11 y CEM<sup>LO2</sup> se han caracterizado mediante inmunocitoquímica y análisis por citometría de flujo poniendo de manifiesto que sobreexpresan CD26 respecto a las líneas parentales (Jurkat y CEM<sup>NO1</sup>). Los dos clones que sobreexpresan CD26 se adhieren mucho más (~35-50%) a la monocapa de células CACO-2 que las líneas

no transfectadas. Es decir, hay una buena correlación entre la proporción de CD26 "libre" expresado en la superficie de las células sanguíneas y la adhesión a las células epiteliales. Todo parece indicar que la interacción ADA/CD26 tiene un papel relevante en esta adhesión. Los ensayos con ADA exógena y anticuerpos anti-CD26 parecen confirmar esta hipótesis. Tras la incubación de las células Jurkat con ADA exógena o con un anticuerpo anti-CD26 dirigido contra el centro de unión de la ADA al CD26 (Ta 5.9), disminuye la adhesión de los linfocitos T a las células CACO-2. Es importante resaltar que en el clon Jurkat#11 la incubación con 50 µg/ml de ADA exógena reduce de forma significativa (75%) la adhesión en una proporción similar a la observada tras la incubación con el anticuerpo Ta5.9. Es decir, aquellos tratamientos que bloquean el centro de unión de la ADA al CD26 "libre" expresado en la superficie de los linfocitos T disminuye la adhesión. Todos los resultados apuntan al CD26 como la molécula que en linfocitos está participando en la adhesión celular. Nuestro siguiente objetivo ha sido confirmar que es la ADA de la superficie de las células CACO-2 la que vía la interacción con el CD26 permite la adhesión de los linfocitos a las células epiteliales. La incubación de la monocapa de células CACO-2 con ADA exógena aumenta (~ 25-30%) la adhesión. Podemos concluir de todo ello que a nivel molecular, la contribución de la interacción ADA/CD26 en la adhesión de los linfocitos a las células CACO-2 tiene lugar entre el CD26 "libre" de la membrana plasmática de los linfocitos y la ADA de la superficie de las células epiteliales anclada a la membrana vía el receptor  $A_1$  de adenosina o el CD26. La estequiometría del complejo ADA/CD26 no se conoce exactamente, sin embargo se asume que el CD26 presenta un único sitio de unión de la ADA y que esta es un monómero. Todo ello nos sugiere que la ADA presentada por las células CACO-2 que participa en los fenómenos de adhesión está anclada a la membrana plasmática vía el receptor  $A_1$  de adenosina de manera que el dominio de unión al CD26 queda libre. El receptor  $A_1$  de adenosina de este modo asume un nuevo papel como molécula de presentación de la ADA de la superficie celular al CD26 de la membrana plasmática de células que estén en contacto facilitando de este modo la adhesión entre ellas.

Cabe resaltar sin embargo, que la adhesión célula-célula es un proceso muy complejo en el que participa más de un tipo de molécula por lo que posiblemente el reconocimiento ADA/CD26 por si solo no es suficiente para permitir una adhesión eficiente entre los linfocitos T y las células epiteliales. Una prueba de ello es que la adhesión de las células Jurkat a placas recubiertas de ADA no soporta los lavados necesarios para eliminar las células no adheridas. El papel

de la interacción ADA/CD26 en la adhesión célula-célula podría tener un sentido en las primeras etapas del proceso de adhesión. Es conocido que los linfocitos maduros se encuentran recirculando de forma continua a través de los tejidos utilizando los conductos sanguíneos y linfáticos como grandes redes de circulación. Para desencadenar la respuesta inmune necesitan migrar al tejido inflamado y entrar en contacto con el antígeno. Así, la respuesta inmunológica aguda media cambios en la fisiología epitelial que permiten una respuesta del epitelio frente a los agentes patógenos (Berin et al, 1999; Miura et al, 1998). Los primeros contactos células epiteliales/linfocitos podrían tener lugar a nivel de la interacción ADA/CD26 interacción en linfocitos activaría una ruta de señalización que induciría la activación de lo que propiamente se han llamado moléculas de adhesión. En este sentido nuestros resultados ponen de manifiesto que la transducción de la señal inducida tras la interacción ADA/CD26 activa las integrinas (VLA). Es conocido que los iones divalentes como el  $Mn^{2+}$  o el  $Mg^{2+}$  activan las integrinas induciendo un cambio conformacional de las mismas. Este cambio conformacional conduce a la exposición de un epítipo, HUTS-21 no detectable en la conformación inactiva de las integrinas (Luque et al, 1996). La incubación de los linfocitos (Jurkat y Jurkat#11) con ADA provoca la activación de las integrinas detectada con un anticuerpo monoclonal anti-HUTS-21. Las células que sobreexpresan CD26 (Jurkat #11) requieren mayor concentración de ADA exógena para activar la población total de integrinas. Así mientras en Jurkat una concentración de ADA  $10\mu g/ml$  permite detectar un 75 % de integrinas activadas las células Jurkat #11 precisan una concentración 10 veces superior para conseguir una activación del 60 %. Estos resultados avalan el papel del módulo ADA/CD26 en la adhesión linfocitos T y células epiteliales de modo que los primeros contactos entre el CD26 de los linfocitos y la ADA de la superficie de las células epiteliales permitiría una transducción de la señal que tendría como objetivo la activación de las integrinas que haría efectiva la adhesión célula-célula.

Todos estos resultados suponen un avance en la comprensión de las funciones fisiológicas de la ADA de la superficie celular objetivo principal de este trabajo y a su vez nos sugieren que en general las proteínas de la superficie celular y en particular las proteínas que funcionan como moléculas de unión de la ADA, esto es el receptor  $A_1$  de adenosina y el CD26, presentan un carácter multifuncional. El receptor  $A_1$  de adenosina por un lado modulando a nivel de membrana de un modo antagónico el receptor  $D_1$  de dopamina, modulación en la que participa también la ADA favoreciendo el estado de alta afinidad del

receptor de adenosina y por otro lado como molécula de presentación de la ADA al CD26, cuya interacción mediante activación de las integrinas tiene un papel relevante en la adhesión célula-célula.



## CONCLUSIONES





## CONCLUSIONES

Todos los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral sugieren que la ADA de la superficie celular así como sus proteínas de unión tienen un carácter multifuncional. Esto abre nuevas perspectivas en el estudio de la funcionalidad de las proteínas de membrana puesto que los efectos observados tras la activación de una proteína a nivel de membrana tiene que entenderse como el resultado de co-modulaciones no tan sólo, como se consideraba hasta ahora, a nivel intracelular (segundos mensajeros, factores de transcripción) sino a nivel de la propia membrana plasmática.

- 1- El receptor  $A_1$  de adenosina funciona como molécula de unión de la ADA de superficie en las células de túbulo proximal de riñón de cerdo LLC-PK1. Tras la activación del receptor con el agonista R-PIA ambas proteínas internalizan siguiendo la misma cinética y la misma ruta endocítica que implica caveolas.
- 2- Se ha demostrado que en fibroblastos de ratón doblemente transfectados con el cDNA de los receptores  $A_1$  de adenosina y  $D_1$  de dopamina y en neuronas corticales de rata ambos receptores forman heterómeros funcionales. Estos complejos receptor-receptor están modulados de forma diferencial por los agonistas adenosínicos y los agonistas dopaminérgicos.
- 3- La ADA de superficie está presente en estos heterómeros codistribuyendo con ambos receptores. El receptor  $A_1$  de adenosina en estos complejos es el único que funciona como molécula de unión de la ADA. Así el tratamiento con el agonista dopaminérgico que induce la agregación del receptor de dopamina y la pérdida de colocalización entre ambos receptores también induce la pérdida de colocalización entre la ADA y el receptor de dopamina.
- 4- La forma agregada del receptor  $D_1$  de dopamina es una forma funcionalmente acoplada a la adenilato ciclasa. La incubación de las células A1R/D1R con ambos agonistas simultáneamente evita la agregación de ambos receptores y es en estas condiciones en las que el receptor de dopamina puede desensibilizarse.

- 5- El receptor  $A_1$  de adenosina en su estado de alta afinidad, esto es unido a la ADA, modula de forma antagónica las características de unión del receptor  $D_1$  de dopamina.
  
- 6- El complejo ADA/CD26 tiene un papel relevante en la adhesión célula-célula. La interacción entre ambas moléculas permite por un lado establecer los primeros contactos célula-célula en el proceso de adhesión y por otro lado la señalización vía CD26 induce la activación de las integrinas que conduce a una efectiva adhesión.

## BIBLIOGRAFÍA



Abbracchio, M. P., Brambilla, R., Camisa, M., Rovati, G. E., Ferrari, R., Canevari, L., Dagani, F., Cattabeni, F. (1995). Adenosine A1 receptors in rat brain synaptosomes. Transduccional mechanisms, effects on glutamate release, and preservation after metabolic inhibition. *Drug. Develop. Res.* **35**, 119-129.

Abbracchio, M. P., Burnstock, G. (1998). Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* **78**, 113-1145.

Aguilar, J. S., Tan, F. L., Durand, I., Green, R. D. (1995). Isolation and characterization of an avian A1 adenosine receptor gene and a related cDNA clone. *Biochem. J.* **307**, 729-734.

Ali, H., Cunha-Melo, J. R., Saul, W. F., Beaven, M. A. (1990). Activation of phospholipase C via adenosine receptors provides synergistic signals for secretion in antigen-stimulated RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 745-753.

Anderson, R. G. W. (1991). *Molecular Motors that Shape Endocytic Membrane. Intracellular trafficking of proteins* (Steers, J., ed) Cambridge University Press. London.

Anderson, R. G. Dissecting clathrin-coated pits. (1992). *Trends. Cell. Biol.* **2**, 177-179.

Anderson, R. G. W., Kamen, B. A., Rothberg, K. G., and Lacey, S.W. (1992). Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science.* **255**, 410-411.

Anderson, R. G. Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins (1993a). *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 647-52.

Anderson, R. G. (1993b). Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**, 10909-13.

Aran, J. M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrans, J. L., Franco, R. (1991). Presence of adenosin deaminase on the surface of mononuclear blood cells. Immunohistochemical localization using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **39**, 1001-1008.

Arch, J. R. S. And Newsholme, E. A. (1978). The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem.* **14**, 82-123.

Arreaza, G., Melkonian, K. A., LaFevre-Bernt, M., Brown, D. A. (1994). Triton X-100 resistant membrane complexes from cultured kidney epithelial cells contain the Src family protein tyrosine kinase p62yes. *J. Biol. Chem.* **269**, 19123-19127.

Arroyo, A. G., Sanchez Mateos, O., Campanero, M. R., Martin-Padura, I., Dejana, E., Sanchez-Madrid, F. (1992). Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J. Cell. Biol.* **117**, 659-670.

Arroyo, A. G., García Pardo, A., Sanchez-Madrid, F. (1993). A high affinity conformational state on VLA integrin heterodimers induced by an anti- $\beta_1$  chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **268**, 9863.

Baer, H. P., and Vriend, R. (1984). Measurements of adenosine metabolism and uptake in smooth muscle and effects of adenosine transport inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **229**, 564-570.

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

Ballarin, M., Reiriz, J., Ambrosio, S., Mahy (1995). Effect of locally infused 2-chloroadenosine, an A1 receptor agonist, on spontaneous and evoked dopamine release in rat neostriatum. *Neurosci. Lett.* **185**, 29-32.

Bamezai, A., Goldmacher, V. S., Rock, K. L. (1992). Internalization of glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored lymphocyte proteins II. GPI-anchored and transmembrane molecules internalize through distinct pathways. *Eur. J. Immunol.* **22**, 15-21.

Barak, L. S., Ferguson, S. S. G., Zhang, J., Martenson, C., Meyer, T., Caron, M. C. (1997). Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol. Pharmacol.* **51**, 177-184.

Barrington, W. W., Jacobson, K. A., Stiles, G. L (1989). Demonstration of distinct agonist and antagonist conformations of the  $\alpha_1$  adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13157-13164.

Beaven, M. A., Ramkumar, V., Ali, H. (1994). Adenosine A<sub>3</sub> receptors in mast cells. *Trends. Pharmacol, Sci.* **15**,13-14.

Bellardinelli, L. (1993). Adenosine system in the heart. *Drug. Develop Res.* **28**, 263-267.

Benovic, J. L., Bouvier, M., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1988). Regulation of adenylyl cyclase-coupled beta adrenergic receptors. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**, 405-428.

Berin, M. C., McKay, D. M., Perdue, M. H. (1999). Immune-epithelial interactions in host defense. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**. 16.

Bernard, V., Le Moine, C., Bloch, B. (1991). Striatal neurons express increased levels of dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA in response to haloperidol treatment: a quantitative in situ hybridization study. *Neuroscience.* **45**, 117-126.

Bernard, G., Zoccola, D., Ticchioni, M., Brerttmayer, J., Aussel, C., Bernard, A. (1994). Engagement of the CD45 molecule induces homotypic adhesion of human thymocytes through a LFA-1/ICAM-3- dependent pathway. *J. Immunol.* **152**, 5161-5170.

Berry, S. A., Shah, M. C., Khan, N., Roth, B. L. (1996). Rapid agonist-induced internalization of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor occurs via the endosome pathway in vitro. *Mol. Pharmacol.* **50**, 306-313.

Biaggioni, I. (1992). Contrasting excitatory and inhibitory effects of adenosine in blood pressure regulation. *Hypertension.* **20**, 457-465.

Bjelke, B., Goldstein, M., Tinner, B., Andersson, C., Sesack, S. R., Steinbusch, H. W., Lew, J. Y., He, X., Watson, S., Tengroth, B., Fuxe, K. (1996). Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J. Chem. Neuroanat.* **12**, 37-50.



Blanco, J., Canela, E. I., Sayós, J., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1993). Adenosine nucleotides and adenosine metabolism in pig kidney proximal tubule membranes. *J. Cell Physiol.* **157**, 77-83.

Birnbaumer, L. (1990). G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 675-705.

Böhm, S. K., Grady, E. F., Bunnett, N. W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled-receptors. *Biochem.* **322**, 1-18.

Bomsel, M., Mostov, V. (1991). Sorting of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**, 647-653.

Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Driscoll, P. C. (1999). Endocytosis: How dynamin sets vesicles free!. *Curr. Biol.* **22**, R301-R304.

Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M. F., Benovic, J. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1987). Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor function by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **262**, 3106-3114.

Bourne, H. R., Sanders, D. A., McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanisms. *Nature.* **349**, 117-127.

Burnstock, G., (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* **24**, 509-581.

Bunzow, J. R., van Tol, H. H. M., Grandy, D. K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C. A., Neve, K. A., Civelli, O. (1988). Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature.* **336**, 783.

Braday-Kalnay, S. M., Tonks, N. K. (1995). Protein Tyrosine phosphatases as adhesion receptors. *Curr. Opin. In. Cell. Biol.* **7**, 650-657.

Broad, R. M. and Fredholm, B. B. (1996). A1, but not A2a, adenosine receptors modulate electrically stimulated  $^{14}\text{C}$ -acetylcholine release from rat cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 193-197.

Bruns, R. F., Lu, G. H, Pugsley, T. A (1986). Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labeled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. *Mol. Pharmacol.* **29**, 331-346.

Bruns, R. F., Lu, G. H, Pugsley, T. A (1987). In: *Topics and perspectives in adenosine research*. Pp 59-73. (Eds. E. Gerlach and B. F. Becker). Springer-verlag, Heidelberg.

Caille, I., Dumartin, B., Bloch, B. (1996). Ultrastructural localization of D1 dopamine receptor immunoreactivity in rat striatonigral neurons and its relation with dopaminergic innervation. *Brain. Res.* **730**, 17-31.

Cali, J. J., Balcueva, E. A., Rybalkin, I., Robisshaw, J. D. (1992). Selective tissue distribution of G protein  $\gamma$  subunits, including a new form of the  $\gamma$  subunits identified by cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* **267**, 24023-24027.

Campbell, P. T., Hnatowich, M., O' Dowd, B. F., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P. (1991). Mutations of the human  $\beta$ 2-adrenergic receptor that impair coupling to G<sub>s</sub> interfere with receptor down regulation but not sequestration. *Mol. Pharmacol.* **39**, 192-198.

Caron, M. G., Beulieu, M., Raymond, V., Gagne, B., Drouin, R., Lefkowitz, R. J., Labrie, F. (1978). Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.* **253**, 2244-2255.

Carson, D. A., Kaye, J., Seegmiller, J. E. (1987). Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency: possible role of nucleoside kinase (s). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5677-5681.

Carruthers, A. M and Fozard, R. F (1993). Adenosine A<sub>3</sub> receptors. two into one won't go. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 290-291.

Carruthers, A. M and Fozard, R. F (1994). Carruthers and Fozard reply. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 14.

Cass, C. E. Young, J. D., Baldwin, S. A (1998). Recent advances in the molecular biology of nucleotide transporters of mammalian cells. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 761-770.

Catania, M. V., Sortino, M. A., Rampello, P. L., Canonico, P. L., Nicoletti, F. (1991). Adenosine deaminase increases release of excitatory amino acids through a mechanism independent of adenosine depletion. *Neuropharmacol.* **30**, 153-159

Centelles, J. J., Franco, R., Canela, E. I., Bozal, J. (1986). Kinetics of the 5'-nucleotidase and the adenosine deaminase in subcellular fractions of the rat brain. *Neurochem. Res.* **11**, 471-479.

Chang, Z., Nygaard, P., Chinault, C., Kellems, R. E. (1991). Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionary conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry.* **30**, 2273-2280.

Chang, W. J., Ying, Y., Rothberg, K., Hooper, N., Turner, A., Gambliel, H., De Gunzburg, J., Mumby, S., Gilman, A and Anderson, R. G. W. (1994) Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell. Biol.* **126**, 127-138.

Chang, M. P., Mallet, W. G., Mostov, K. E., Brodsky, F. M. (1993). Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of  $\alpha$ -adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP2) components of clathrin-coated pits. *EMBO. J.* **12**, 2169-2180.

Che, M., Ortiz, D. F., Arias, I. M. (1995). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the bile canalicular purine-specific Na<sup>+</sup>-nucleoside co-transporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 13596-13599.

Chen, W. T., Lee, C., Goldstein, L., Bernier, S., Liu, C-Y., Lin, C., Yeh, Y., Monsky, W. K., Kelly, T., Zhou, J., Mueller, S. (1994). Membrane proteases as potential diagnostic and therapeutic targets for breast malignancy. *Breast Cancer Res. And. Treat.* **31**, 217-226.

Chun, M., Liyanage, U., Lisanti, M. P., and Lodish, H. F. (1994). Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11728-11732.

Ciruela, F., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C. and Franco, R. (1995). Immunological identification of A<sub>1</sub> adenosine receptors in brain cortex. *J. Neurosci. Res.* **42**, 818-829.

Ciruela, F., Saura, C., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C. and Franco, R. (1996). Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. *FEBS Letters.* **380**, 219-223.

Ciruela F., Saura C., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C. And Franco, R. (1997). Ligand-induced phosphorylation, clustering and desensitization of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **52**, 778-797.

Civelli, O., Bunzow, J. R., Grandy, D. K. (1993). Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 281-307.

Clapham, D. E., and Neer, E. J. (1993). New roles for G protein  $\beta\gamma$  dimers in transmembrane signaling. *Nature.* **365**, 403-406.

Clark, R. B. (1986). Desensitization of hormonal stimuli coupled to regulation of cyclic AMP levels. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Protein. Phosphorylation res.* **20**, 151-209.

Cohen, F. R., Lazareno, S., Birdsall, N. J. M. (1996). The affinity of adenosine for the high- and low affinity states of the human adenosine A<sub>1</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **309**, 111-114.

Collins, S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1991). Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 497-508.

Conklin, B. R., and Bourne, H. R. (1993). Structural elements of G $\alpha$  subunits that interact with G $\beta\gamma$ , receptors and effectors. *Cell.* **73**, 631-641.

Conway, E. J and Cooke, R. (1939). The deaminases of adenosine and adenyloc acid in blood and tissues. *Biochem. J.* **33**, 479-492.

Corley-Mastick, C., Brady, M. J., and Saltiel, A. R. (1995) Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell. Biol.* **129**, 1523-1531.

Cornfield, L. J., Hu, S., Hurt, S. D., Sills, M. A. (1992). [<sup>3</sup>H]2-phenylaminoadenosine ([<sup>3</sup>H]CV1808) labels a novel adenosine receptor in the brain. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **263**, 552-561.

Couet, J., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P. (1997). Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. *J. Biol. Chem.* **272**, 30429-30438.

Crawford, C. R., Patel, D. H., Naeve, C., Belt, J. A. (1998). Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in an transporter-deficient cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 5288-5293.

Cunha, R. A., and Sebastiao, A. M. (1993). Adenosine and adenine nucleotides are independly released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. *Plügers. Arch.* **424**, 503-510.

Cunha, R. A., Milusheva, E., Vizi, E. S., Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M. (1994). Excitatory and inhibitory effects of A1 and A2a adenosine receptor activation on the electrically evoked [<sup>3</sup>H] acetylcholine release from different areas of the rat hippocampus. *J. Neurochem.* **63**, 207-214.

Dälziel, H. H., Westfall, D. P. (1994). Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacological Reviews.* **46**, 449-466.

Daddona, P. E., Kelley, W. N. (1977). Human adenosine deaminase. Purification and subunit structure. *J. Biol. Chem.* **252**, 110-115.

Daddona, P. E., Kelley, W. N. (1978). Human adenosine deaminase. Binding protein. Assay, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **253**, 4617-4623.

Daddona, P. E., Shewach, D. S., Kelley, W. N., Argos, P., Marham, A.F., Orkin, S. H. (1984). Human adenosine deaminase. cDNA and complete primary amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **259**, 12101-12106.

Dal Toso, R., Sommer, B., Ewert, M., Herb, A., Pritchett, D. B., Bach, A., Shivers, B. D., Seeburg, P. H. (1989). The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO*. **8**, 4025.

Daly, J. W., Butts-Lamp, P and Padgett, W. (1983). Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system. Interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell. Mol Neurobiol.* **3**, 69-80.

Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicles formation. *J. Cell. Biol.* **127**, 915-934.

Daukas, G., Zigmond, S. H. (1985). Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leucocytes. *J. Cell. Biol.* **191**, 1673-1679.

Dearry, A., Gingrich, J. A., Falardeau, P., Fremeau, R. T. Jr., Bates, M. D., Caron, M. G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*. **347**, 72-76.

Demchyshyn, L. L., Sugamori, K. S., Lee, F. J. S., Hamadanizadeh, S. A., Niznik, H. B. (1995). The dopamine D1B receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D1-like receptors from *Gallus domesticus*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4005-4012.

Deckert, J., Nöthen, M. M., Bryant, S. P., Ren, H., Wolf, H. K., Stiles, G. L., Spurr, N. K., Propping, P. (1995). Human adenosine A1 receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 1q31-32.1 using a silent polymorphism in the coding region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 614-621.

Denker, B. R., Neer, E. J., Schmidt, C. J. (1992). Mutagenesis of the amino terminus of the  $\alpha$  subunit of the G protein  $G_{\alpha_0}$ : in vitro characterization of  $\alpha_0\beta\gamma$  interactions. *J. Biol. Chem.* **267**, 6272-6277.

De Meester, I., Vanham, G., Kestens, L., Vanhoof, G., Bosmans, E., Gigase, P., and Scharpe, S. (1994). Binding of adenosine deaminase to the lymphocyte surface via CD26. *Eur. J. Immunol.* 24, 566-570.

De Weerd, W. F. And Leeb-Lundberg, L. M. (1997). Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 17858-17866.

Di Fiore, P. P., Gill, G. N. (1999). Endocytosis and mitogenic signalling. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 483-488.

Dickenson, J. M., Hill, S. J. (1993). Adenosine A1-receptor stimulated increases in intracellular calcium in the smooth muscle cell line, DDT<sub>1</sub>MF-2. *Br. J. Phramacol.* 108, 85-92.

Dinjens, W.N.M., vand der Boon, J.; Kate,J; Zeij Lemaker, W.P; de Bruijn, C.H.M.M; Bosman, F.T.; Khan, P.M. (1986). Cell Surface adenosine deaminase (ADA) and its complexing protein (ADCP) in human T-lymphoit cells. *Adv. Expl.Med.Biol.*195B, 407-414.

Dinjens, W. N. M., Kate, J., Wijnen, J.T. H., van der Linden, E. P. M., Beek, C. J. L., Lenders, M-H. J.H., Khan, P. M., Bossman, F. T. (1989). Distribution of adenosine deaminase-complexing protein in murine tissues. *J. Biol. Chem.* 264, 19215-19220.

Dixon, A. K., Gubitz, A. K., Sirinathsinghji, D. J. S., Richardson, P. J., Freeman, T. C. (1996). Tissue distribution of adenosine receptor m RNA in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1461-1468.

Dohlman, H. G., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1987). A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry.* 26, 2657-2664.

Dohlman, H. G., Caron, M. G., Deblasi, A., Frielle, T., Lefkowitz, R. J. (1990). A role of extracellular disulfide bonded cysteines in the ligand binding function of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor. *Biochemistry.* 29, 2335-2342.

Dolphin, A. C., Forda, S. R., Scott, R. H. (1996). Calcium-dependent currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones are inhibited by an adenosine analogue. *J. Physiol.* **373**, 47-61.

Dong, R. P., Kameoka, J., Hege, M., Tanaka, T., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. (1996). Characterization of adenosine-deaminase binding to human CD26 on T cells and its biological role in immune response. *J. Immunol.* **156**, 1349.

Doss RC, Perkins JP, Harden TK. (1981). Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem* . **256**, 12281-12286

Drake, M. E., and Petersen, S. A. (1992). ATP overflow from the mouse isolated vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **105**, 825-830.

Dransfield, I., Cabanas, C., Bauret, J., Hogg, N. (1992). Interaction of leukocyte integrins with ligands is necessary but not sufficient for function. *J. Cell. Biol.* **116**, 1527.

Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Osaka, K., Suzuki, F., Jackson, E. K. (1996). Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. *Hypertension*, **27**, 786-793.

Felder, C. C., Albrecht, F. A., Campbell, T., Eisner, G. M., Jose, P. A. (1993). CAMP-independent, G protein-linked inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in renal brush border by D1 agonist. *Am. J. Physiol.* **264** (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.*33): F1032-F1037.

Felder, C. C., Campbell, T., Albrecht, F. A., Jose, P. A. (1990). Dopamine inhibits Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am. J. Physiol.* **259** (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 28): F297-F303.



Fernandez, M., Svenningsson, O., Fredholm, B. B. (1996). Adaptative changes in adenosine receptors following long-treatment with the adenosine receptor agonist R-PIA. *Life. Sci.* **58**, 769-776.

Feron, O., Smith, T. W., Michel, T., Kelly, R. A. (1997). Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 17744-17748.

Ferré, S., Herrera-Marschitz, M., Grabowska-Andén, M., Ungerstedt, U., Casas, M., Andén, N-E. (1991). Postsynaptic dopamine/adenosine interaction: I. Adenosine analogues inhibit a D<sub>2</sub> mediated behaviour in short-term reserpinized mice. *Eur. J. Pharmacol.* **192**,30-35.

Ferré, S., Fuxe K, von Euler G, Johansson B, Fredholm, B. B. (1992). Adenosine-dopamine interactions in the brain. *Neuroscience.* **51**, 501-512.

Ferré, S., Poppoli, P., Gimenez-Llort, L., Finnman, U-B., Martinez, E., Scotti de Carolis, A., Fuxe, K. (1994). Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A<sub>1</sub> and Dopamine D<sub>1</sub> receptors. *NeuroReport* **6**. 73-76.

Ferré, S., O' Connor, W. Svenningsson, P., Björklund, L., Lindberg, J., Tinner, B., Strömberg, I., Goldstein, M., Ögren, S., Ungerstedt, U., Fredholm, B. B., Fuxe, K. (1996). Dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in the rat strioentopeduncular pathway and its modulation of adenosina A<sub>1</sub> receptor-mediated mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1545-1553.

Ferré, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P., Fuxe, K. (1997). Adenosine-dopamina receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends. Neurosci.* **20**, 482-487.

Ferré, S. (1997). Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology.* **133**, 107-120.

Ferre, S., Torvinen, M., Antoniou, K., Irenius, E., Civelli, O., Arenas, E., Fredholm, B. B., Fuxe, K. (1998). Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated modulation

of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 4718-4724.

Fiedler, J. L., Pollard, H. B., Rojas, E. (1992). Quantitative analysis of depolarization-induced ATP release from mouse brain synaptosomes. External calcium dependent and independent processes. *J. Membr. Biol.* **127**, 21-33.

Fisher, M. N. and Newsholme, E. A. (1984). Properties of rat-heart adenosine kinase. *Biochem. J.* **221**. 521-528.

Fleischer, B. (1987). A novel pathway of human T cell activation via 103KD T cell activation antigen. *J. Immunol.* **138**, 1346-1349.

Fleischer, B. (1994). CD26: a surface protease involved in T cell- activation. *Immunol Today.* **15**, 180-184.

Fleisher, B. (1995). Dipeptidyl peptidase IV (CD26) in metabolism and the immune response. *Ed. R: G: Landes Company. Austin. Texas, U.S.A.*

Fonoll, C., Canela, E. I., Bozal, J. (1982). Characterization of the forms of bovine liver adenosine deaminase. *Int. J. Biochem.* **14**, 679-683.

Fox, D. A., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Actuo, O., Poole, C., Palley, L., Daley, J. F., Schlossman, S. F., and Reinherz, E. L. (1984). Ta1, a novel 105KD human T cell activation antigen, defined by a monoclonal antibody. *J. Immunol.* **133**, 1250-1256.

Franco, R., Aran, J. M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrans, J. L. (1990). Association of adenosine deaminase with erythrocytes and platelet plasma membrane: an immunological study using light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 653-660.

Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C. (1997). Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurosci.* **52**, 283-294.

Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., Blanco, J. (1998). Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol. rev.* **161**, 27-42.

Fraser, C. M., Chung, F-Z., Wang, C. D., Venter, J. C. (1988). Site-directed mutagenesis of human  $\beta$ -adrenergic receptors: substitution of aspartate-130 by Asn produces a receptor with high affinity agonist binding that is uncoupled from adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5478-5482.

Fraser, C. (1989). Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 9266-9270.

Fredholm, B. B and Dunwiddie, T.V. (1988). Subtypes of adenosine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 280.

Fredholm, B. B., Proctor, W., van der Ploeg, I., Dunwiddie, T. V. (1989). In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **172**, 249-262.

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., Leff, P. And Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol. Rev.*, **46**, 143-156.

Fredholm, B. B (1995). Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol. Toxicol.* **76**, 93-101.

Fredholm, B. B (1995). Purinoreceptors in the nervous system. *Pharmacol. Toxicol.* **76**, 228-239.

Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Dubyak, G. R., Harden, K., Jacobson, K. A., Schwabe, U., Williams, M. (1997). Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* **18**, 79-82.

Fredholm, B. B., and Sollevi, A. (1986). Cardiovascular effects of adenosine. *Clinical. Physiol.* **6**, 1-21.

Freissmuth, M., Schütz, W., Linder, M. E. (1991). Intercations of the bovine brain A<sub>1</sub>-adenosine receptor with recombinant G protein  $\alpha$ -subunits. Selectivity for rG<sub>i $\alpha$ -3. *J. Biol. Chem.* **266**, 17778-177783.</sub>

Freneau, R. J. Jr., Duncan, G. E., Fornaretto, M-G., Dearry, A., Gingrich, J. A. (1991). Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective and neuroendocrine aspects of dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 3772-3776.

Freund, S., Ungerer, M., Lohse, M. J. (1994). A1 adenosine receptor expressed in CHO-cells couple to adenylyl ciclase and to phospholipase C. *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.* **350**, 49-56.

Frick, L., Wolfenden, L., Smal, E., Baker, D. C. (1986). Transition-state stabilization by adenosine: structural studies of its inhibitory complex with deoxycofimicin. *Biochemistry.* **25**, 1616-1621.

Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Ogawa, K. (1992). Localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell. Biol.* **119**, 1507-1513.

Fuxe, K., Ferré, S., Zoli, M., Agnati, L.F.(1998). Integrated events in central dopamine transmission as analysed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2a/dopamine D2 and A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain. Research. Reviews.* **26**, 258-273.

Gale, K., Guidotti, A., Costa, E. (1977). Dopamine sensitive adenylyate cyclase location in substantia nigra. *Science.* **195**, 503-505.

Garcia-Cardena, G., oh, P., Liu, j., Schnitzer, J.E., and Sessa, W.C. (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endotelial cell caveolae via palmitoylation implications for nitric oxide signaling. *PNAS.* **93**, 6448-6453.

Geiger, J. D., and Fyda, D. M. (1991). Adenosine transport in nervous system tissues. In: *Adenosine in the nervous system.* pp 1-24. (Ed. T. Stone). Academic Press, London.

Gerwins, P., Nordstedt, C., Fredholm, B. B. (1990). Characterization of adenosine A1 receptors in intact DDT<sub>1</sub> MF-2 smooth muscle cells. *Mol. Phramacol.* **38**, 660-666.

Gerwins, P., Fredholm, B. B. (1992). ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1, 4, 5-triphosphate in a smooth muscle cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 16081-16087.

Gesek, F. A., and Schoolwerth, A.C. (1990). Hormonal interactions with the proximal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Am. J. Physiol.* **258** (Renal Fluid Electrolyte Physiol, 27): F514-F521.

Ghinea, N., Vuhai, M. T., Groyer-Picard, M. T., Houiller, A., Schoevaert, D., Milgrom, E. (1992). Pathways of internalization of the hCG/LH receptor: immunoelectron microscopic studies in Leyding cells and transfected L-cells. *J. Cell. Biol.* **118**, 1347-1358.

Gingrich, J. A., and Caron, M. G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 229-321.

Glennay, J. R., Jr (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa proteins is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* **264**, 20163-20166.

González-Calero, G., Cubero, A., Klotz, K-N. (1992). G-protein coupled A1 adenosine receptors in coated vesicles of mammalian brain: characterization by radioligand binding and photoaffinity labelling. *Cell. Signal.* **4**, 737-745.

Goodman, B., O. Krupnich J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A.W., Keen, J. H., benovic, J. L. (1996).  $\beta$ -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *Nature.* **383**, 447-450.

Gordon, J. L., Pearson, J. D., Dickinson, E. S., Moreau, D., and Slakey, L. L. (1989). The hydrolysis of extracellular adenosine nucleotides by arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **264**. 18986-18992.

Grandy, D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., Stofko, R. E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J. B., Burke-Hpwie, K. J., Bunzow, J. R., Sever, C. (1989). Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 9762-9766.

Grandy, D. K., Zhang, Y., Bouvier, C., Zhou, Q-Y., Johnson, R. A., Allen, L., Buck, K., Bunzow, J. R., Salon, J., Civelli, O. (1991). Multiple human D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9175-9179.

Griffiths, M., Beaumont, N., Yao, S. Y. M., Sundaram, M., Boumah, C. E., Davies, A., Kwong, F. Y. P., Coe, I., Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A. (1997). Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nature. Medicine.* 3, 89-93.

Griffiths, M., Yao, S. Y. M., Abidi, F., Phillips, S. E. V., Cass, C. E., Young, J. D., Baldwin, S. A. (1998). Molecular cloning and characterization of a nitrobenzylthioinosine-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter from human placenta. *Biochem. J.* 328, 739-743

Gu, J. G., and Geiger, J. D. (1992). Transport and metabolism of D-[<sup>3</sup>H] Adenosine and L-[<sup>3</sup>H] Adenosine in rat cerebral cortical synaptoneurosomes. *J. Neurochem.* 58, 1699-1705.

Gustafsson, L. E., Wiklund, C. U., Wiklund, N. P., Stelius, L. (1990). Subclassification of neuronal adenosine receptors. In Purines in Cellular Signaling. Targets for New Drugs., 200-205 (Eds. K. A. Jacobson, J. W. daly and V. Manganiello), Springer, New York.

Hadcock, J. R., Malbon, C. C. (1993). Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G-proteins. *J. Neurochem.* 60, 1-9.

Hamilton, S. R. (1996). Anti-peptide antibodies as probes of the structure and subcellular distribution of the sodium-dependent nucleoside transporter rCNT1. *J. Physiol.* 499, P50-P51.

Hansen, S. H., Sandving, K., van Deurs, B. (1991). The preendosomal compartments comprises distinct coated and noncoated endocytic vesicle populations. *J. Cell. Biol.* 113, 731-741.

Hansen, S. H., Sandving, K., van Deurs, B. (1993). Molecules internalized by clathrin-independent endocytosis are delivered to endosomes containning transferrin receptors. *J. Cell. Biol.* 123, 89-97.

Hausdorff WP, Catt KJ. (1988). Activation of dihydropyridine-sensitive calcium channels and biphasic cytosolic calcium responses by angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology.* 123.2818-2826.

Hausdorff WP., Campbell, P. T., Ostrowski, J. (1991). A small region of the  $\beta$ -adrenergic receptor is selectively involved in its rapid regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 2979-2983.

Harder, T., Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of shingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 534-542.

Hasuo, H., Shoji, S., Gallagher, J. P., Akasu, T. (1992). Adenosine inhibits the synaptic adenosine receptors. *Neurosci. Lett.* **196**, 205-208.

Hebert, T. E., Moffet, S., Morello, J-P., Loisel, T. P., Bichet, D. G., Barret, C., Bouvier, M. (1996). A peptide derived from a  $\beta_2$ -adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 16364-16392.

Hegen, M., Niedobitek, G., Klein, C. E., Stein, H., and Fleischer, B. (1990). The T-cell triggering molecule Tp 103 is associated with dipeptidyl aminopeptidase IV activity. *J. Immunol.* **144**, 2908.

Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., Hubbard, A. (1983). Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 245-250.

Hemler, M. E. (1990). VLA proteins in the integrin family: structures function and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 365.

Hepler, J. R and Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 383-387.

Hettinger-Smith, B. D., Leid, M., Murray, T. F. (1996). Chronic exposure to adenosine receptor agonist and antagonists reciprocally regulates the A1 adenosine receptor-adenylyl cyclase system in cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* **67**, 1921-1930.

Hill, R. J., Oleynek, J. J., Hoth, C. F., Kiron, M. A. R., Weng, W., Wester, R. T., Tracey, W. R., Knight, D. R., Buchholz, R. A., Kennedy, S. P. (1997). Cloning, expresion and pharmacological characterization of rabbit adenosine a1 and Ae receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 122-128.

Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1994). Identification of factor (s) involved in releasing adaptor proteins from isolated coated vesicles. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 435.

Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicles budding. *Nature* **374**, 190-192

Hirschhorn, R. (1975). Conversion of human erythrocyte adenosine deaminase activity to different tissue-specific isozymes. *J. Clin. Invest.* **55**, 661-667.

Hirschhorn, R., Yang, D. R., Israni, A. (1994). An Asp<sup>8</sup> Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA-2 allozyme). Occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Annu. Hum. Genet.* **58**, 1-9.

Hynes, R. O. (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* **48**, 549.

Hoxie, J. A., Ahuja, M., Belmonte, E., Pizarro, S., Parton, R., Brass, L. F. (1993). Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* **268**: 13756-13763.

Huang, Q-Q (1994). Cloning and functional expression of a complementary cDNA encoding a mammalian nucleoside transport protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 17757-17760.

Iredale, P. A., Alexander, S. P. H., Hill S. J. (1994). Coupling of a transfected human brain A1 adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilization via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 1252-1256

Jacobson, K. A. (1990). Adenosine (P1) and ATP (P2) receptors. *In Comprehensive Medicinal Chemistry, Vol, 3, Membranes and Receptors*, 601-642. (Eds. C. Hansch, P. G. Sammes, J. B. Taylor), Pergamon Press, Oxford.

Jacobson, K. A., Stiles, G. L., Ji, X-D. (1992). Chemical modification and irreversible inhibition of striatal adenosine receptors. *Mol. Pharmacol.* **42**, 123-133.

Jacobson, K. A., van Galen, P. J. M., Ji, X-D., Ramkumar, V., Olah, M. E., Stiles, G. L. (1993). [<sup>3</sup>H] xantine amine congener of 1, 3-dipropyl-8-phenylxantine, an



antagonist radioligand for adenosine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4089-4093.

Jacobson, K. A., Park, K-S., Jiang, J-L., Kim, Y-C., Olah, M. E., Stiles, G. L., Ji, X-D. (1997). Pharmacological characterization of novel A3 adenosine receptor selective antagonist. *Neuropharmacology.* **36**, 1157-1165.

Jarvie, K. R., Silvia, C., Fremeau, R. T., Jr., Gingrich, J. A., Caron, M. G. (1991). Cloning and characterization of a novel human D1 dopamine receptor subtype and its pseudogene. *Soc. Neurosci. Abstr.* **36**, 2.

Jarvis, M. F., Schulz, R., Hutchison, A. J., Do, U. H., Sills, M. A., Williams, M. (1988). Adenosine transporters. In: *Adenosine receptors*. pp113-123. (Eds. D. M. F. Cooper and Londos). Alan R., Liss Inc., New York.

Ji, X-D., Von Lubitz, D., Olah, M. E., Stiles, G. L., Jacobson, K. A. (1994). Species differences in ligand affinity at central A3-adenosine receptors. *Drug. Dev. Res.* **33**, 51-59.

Jin, S., Johansson, B., Fredholm, B. B. (1993). Effects of adenosine A1 and A2 receptor activation on electrically evoked dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**, 801-808.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C.(1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature.* **396**, 674-679.

Jarvis, M. F., Schulz, R., Hutchison, A. J., Do, U. H., Sills, M. A., Williams, M. (1988). Adenosine transporters. In: *Adenosine receptors*. pp113-123. (Eds. D. M. F. Cooper and Londos). Alan R., Liss Inc., New York.

Jeanfavre, D. D., Woska, J. R., Pargellis, C. A., Kennedy, C. A., Predergast, J., Stearns, C., Reilly, P.L., Barton, R. W., Bormann, B. J. (1996). Effect of deoxycoformycin and val-boropro on the associated catalytic activities of lymphocyte CD26 and ecto-adenosine deaminase. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1757-1765.

Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., dai, M., Yao, W-J., Johnson, M., Gunwaldse, C., Huang, L-Y., Tang, C., Shen, Q., salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., Gerald, C. (1998). GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA<sub>B</sub>R1 and GABA<sub>B</sub>R2. *Nature*. **396**, 674-679.

Jonshon, R. C., Zhu, D., Augustin-Voss, H. G., Pauli, B. U. (1993). Adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* **121**, 1423-1432.

Kai, H., Griendling, K. K., Lassegue, B., Ollerenshaw, J. D., Runge, M. S., Alexander, R. W. (1994). Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. *Hypertension*. **24**, 523-527.

Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F and Morimoto, C. (1993). Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*. **261**, 466-473.

Kanda, T., Jackson, M. J., Smith, L. A., Pearce, R. K. B., Nakamura, J., Kase, H., Kuwana, Y., Jenner, P. (1997). Adenosine A2A antagonist: A novel antiparkinsonian aganet that does not provoke dyskinesi in parkinsonian monkey. *Annals Neurol.* **43**, 507-513.

Kartenbeck, J., Stukenbrock, H., Helenius, A. (1989). Endocytosis of Simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* **109**, 2721-2729.

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*. **396**, 683-687.

Kebabian, J. W., and Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, **277**, 93-96.

Keller, G. A., Siegel, M. W., Caras, I. W. (1992). Endocytosis of glycopospholipid-anchored and transmembrane forms of CD4 by different endocytic pathways. *EMBO. J.* **11**, 863-874.

Khakh, B. S., Kennedy, C. (1998). Adenosine and ATP: progress in their receptors' structures and functions. *Trends.Pharmacol.* **19**, 39-41.

Kibbey, R. G., Rizo, J., Gierasch, L. M., Anderson, R. G. (1998). The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation. *J. Cell. Biol.* **142**, 59-67.

Kim, H. O., Ji, X. D., Siddiqi, S. M., Olah, M. E., Stiles, G. L., Jacobson, K. A. (1994). 2-substitution of N<sup>6</sup>-benzyladenosine 5'-uronamides enhances selectivity for A<sub>3</sub> adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **37**, 3614-3621.

Kimura, K., White, B. H., Sidhu, A. (1995). Coupling of human dopamine receptors to different guanine nucleotide binding proteins. Evidence that D1 dopamine receptor can couple to Go. *J. Biol. Chem.* **270**, 14672,14678.

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

Klotz, K. N. and Lohse, M. J (1986). The glycoprotein nature of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *Biochem. Biophys- res. Commun.* **140**, 406-413.

Krueger, K. M., Pitcher, J. A., Lefkowitz, R. J. (1995). Dephosphorilation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor is stimulated at acid pH. In *9<sup>th</sup> International Conference on second Messengers and Phosphoproteins*, 72 (October26-November1, 1995) Nashville, Tenesse.

Kurose, H., Katada, T., Amano, T., Ui, M. (1983). Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* **258**, 4870-4875.

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

Kurz, L. C., and Frieden, C. (1983). Adenosine deaminase: solvent isotope and pH effects on the binding of transition-state and ground state analogue inhibitors. *Biochemistry*. **22**, 382-389.

Kurz, L. C., La zard, D., Frieden, C. (1985). Adenosine deaminase: viscosity studies and mechanism of binding of substrate and of ground-and transition-state analogue inhibitors. *Biochemistry*. **26**, 3027-3032.

Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M. (1992). Vip21, a 21KD membrane protein is an integral component of trans-Golgi network-derived transport vesicles. *J. Cell. Biol.* **118**, 1003-1014.

Kurzchalia, T. V., Hartmann, E., Dupree, P. (1995). Guilt by insolubility: does a protein's detergent insolubility reflect caveolar location. *Trends Cell. Biol.* **5**, 187-189.

Kurzchalia, T. V., Parton, R. G. (1996). And still they are moving. *FEBS Letters*. **389**, 52-54.

Kurzchalia, T. V., Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 424-431.

Laemmli, U, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

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

Lameh, J. (1996). Structural domains that determine receptor coupling to phospholipase C and receptor internalization. (Ed. Tobin, A. B; R. G. Landes Company)

Lefkowitz, R. J. (1993). G protein-coupled receptor kinases. *Cell*. **74**, 409-412.

Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J. E., hansen, S. H., Nishimoto, I., Lisanti, M. P. (1995). Evidence for a regulated interaction

between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* **270**, 15693-15701.

Libert, F., Van Sande, J., Lefort, A., Czernilofsky, A., Dumont, J. E., Vassart, G., Ensinger, H. A., Mendla, K. D. (1992). Cloning and functional characterization of a human A<sub>1</sub> adenosine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 919-926.

Liggett, S. B. (1999). Molecular and genetics basis of beta2-adrenergic receptor function. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **104**, S42-S46.

Linden, J. (1994). En "Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medial Aspects, 5<sup>th</sup> Ed." Pp. 402-416. (Eds. G. J. Siegel et al). Raven Press, New York.

Linden, J., Taylor, H. E., Robeva, A. S., Tucker, A. L., Sthele, J. H., Rivkees, S. A., Fink, J. S., Reppert, S. M. (1993). Molecular cloning and functional expression of a sheep A<sub>3</sub> adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol. Pharmacol.* **44**, 524-532.

Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z. L., Hermanoski-Vosatka A., Tu, Y. H., Cook, R. F., Sargiacomo, M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source implications for human disease. *J. Cell. Biol.* **126**, 111-126.

Liu, Y. F., Civelli, O., Zhou, Q-Y., Albert, P. R. (1992). Cholera-toxin-sensitive 3'5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium signals of the human dopamine-D1 receptor: selective potentiation by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1815-1824.

Liu, P., Ying, Y., Ko, Y.-G., Anderson, R. G. W (1996). Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol. Chem.* **272**, 6525-6533.

Lloyd, H. G. E. Schrader, J. (1987). The importance of the transmethylation pathway for adenosine metabolism in the heart. In *Topics and perspectives in adenosine research*, 199-209 (Eds E. Gerlach and B. F. Becker), Springer-Verlag, Heidelberg

Lohse, M.J. (1993). Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**, 171-188.

Löhster, K., Zeilinger, K., Schuppan, D., Rentter, W. (1995). The Cysteine-rich region of dipeptidyl peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site.

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

Londos, C., Wolff, J., Cooper, D. M. F. (1983). En "Regulatory Function of Adenosine" pp. 17-32. (Eds. R. M. Berne, T. W. Rall and R. Rubio). Nijhoff, The Hague.

Longabaugh, J. P., Didsbury, J., Spiegel, A and Stiles, G. L (1989). Modification of the rat adipocyte  $A_1$  adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an  $A_1$  adenosine receptor agonist: alterations in the subunity of  $G_{s\alpha}$  and  $G_{i\alpha}$  are not associated with cahnges in their mRNAs. *Mol Pharmacol.* **36**, 681-688.

Luque, A., Gómez, M., Puzon, W., Takada, Y., Sanchez-Madrid, F., Cabañas, C. (1996). Activated conformations of very late activation integrins detected by a group of antibodies (HUTS) specific for a novel regulatori region (355-425) of the common beta 1 chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 11067-11075.

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

Lupidi, G., Falasca, M., Marmocchi, F., Venardi, G., Cristalli, G., Riva, F. (1992). Adenosine deaminase from bovine brain: purification and partial characterization. *Biochem. Int.* **26**, 1053-1063.

Luthin, D. R., and Linden, J. (1994). Temperature dependent binding of [ $^3$ H]CV1808. Mimicry of "A4" binding in COS cells expressing only recombinant A2a adenosine receptors. *Drug. Dev. Res.*, **31**, 292.

Luthin, D. R., and Linden, J. (1995). Comparison of A(4) and A(2<sup>a</sup>) binding-sites in striatum and COS cels transfected with adenosine A(2A) receptors. *j. Phram. Exp. Ther.* **272**, 511-518.

Mahan, L. C., Mcvittie, L. D., Smyk-Randall, E. M., Nakata, H., Monsma, F. J., Gerfen, C. R., Sibley, D. R. (1991). Cloning and expresion of an  $\alpha 1$  adenosine receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **40**, 1-7.

Marguet,D; Bernard,A.M; Vivier,I;Darmoul,D;Naquet,P; Pierres,M. (1992).c DNA clonig for mouse thymocyte-activating molecule: a multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV ( CD26) included in a subgroup of serine proteases.*J.Biol.Chem* **267**, 2200-2208.

Marrone, T.J., Estraatsma, T. P., Briggs, J. M., Wilson, D. K., Quioco, F. A., McCammon, J. A. (1996). Theoretical study of the inhibition of adenosine deaminase by (8R)-coforycin and (8R)-deoxycoformycin. *J. Med. Chem.* **39**, 277-284.

Marsh, M., McMahon, H. T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science.* **285**, 215-220.

Martin, M.,Centelles, J.J., Huguet, J., Echevarne, F., Colomer, D., Vives-Corrns, J. L., Franco, R. (1993). Surface expression of adenosine deaminase in .mitogen-estimate lymphocytes *Clin. Exp.Inmunol.* **93** 286-291.

Martin, M.,Centelles, J.J., Huguet, J., Echevarne, F., Colomer, D., Vives-Corrns, J. L., Franco, R. (1995). Expression of ecto-adenosine deaminase an CD26 in human T cells triggered by the TCR-Cd2 complex. *J. Inmunol.* **155**, 4630-4643.

Martinez, C., Zumalacarregui, J. M., Diez, V., Burgos, J. (1984). Bovine skeletal muscle adenosine deaminase; purification and some properties. *Int. J. Biochem.* **16**, 1279-1282.

Masumoto, A., Hemler, M. E. (1993a). Mutation of putative divalent cation sites in the alpha 4 subunit of the integrin VLA-4 distinct effects on adhesion to CS1/fibronectin, VCAM-1, and invasin. *J. Cell. Biol.* **123**, 245.

Masumoto, A., Hemler, M. E. (1993b). Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic difference between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 228.

Mateo J, Harden TK, Boyer JL. (1999). Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol*. 128, 396-402.

Matsumoto, M., Hidaka, K., Tada, S., Tasaki, Y., Yamaguchi, T. (1995). Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol. Brain. Res.* 11, 107-113.

Mayor, S., Presley, J. F., Maxfield, F. R. (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell. Biol.* 121, 1257-1269.

McCoy, K. L. (1990). Contribution of endosomal acidification to antigen processing. *Semin. Immunol.* 2, 239-246.

McMahon, H. T. (1999). Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr. Biol.* 9, R332-R335.

Meghi, P. (1993). Storage, release, uptake, and inactivation of purines. *Drug Develop. Res.* 28, 214-219.

Meghji, P., Middleton, K., Hassall, C. J., Phillips, M. I., Newby, A. C. (1988). Evidence for extracellular deamination of adenosine in the rat heart. *Int. J. Biochem.* 20, 1335-1340.

Megson, A. C., Dickenson, J. M., Townsend-Nicholson, A., Hill, S. J. (1995). Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoreceptors in CHO-K1 cells. *Br. J. Pharmacol.* 115, 1415-1424.

Mei, Y. A., Lefoll, F., Vaudry, H., Cazin, L. (1996). Adenosine inhibits L-type and N-type calcium channels in pituitary melanotrophs. Evidence for the involvement of a G-protein in calcium channel gating. *J. Neuroendocrinol.* 8, 85-91.

Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663-670.



Meng, F., Xie, G-X., Chalmers, D., Morgan, C., Watson, S. J., Akil, H. (1994). Cloning and characterization of a pharmacologically distinct  $\alpha 1$  adenosine receptor from guinea pig brain. *Mol. Brain. Res.* 26, 143-155.

Miller, L. P. And Hsu, C. (1992). Therapeutic potential for adenosine receptor activation in ischemic brain injury. *J. Neurochem.* 2, 5563-5577.

Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., and Anderson, R. G. W. (1996). Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 11930-11935.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189-225

Miura, S., Tsuzuki, Y., Hokari, R., Ishii, H. (1998). Modulation of intestinal system by dietary fat intake: relevance to Crohn's disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(12). 1183.

Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H., Bouvier, M. (1993). Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human  $\beta 2$ -adrenergic receptor. *EMBO. J.*, 12, 349-356.

Mogul, D. J., Adams, M. E., Fox, A. P. (1993). Differential activation of adenosine receptors decrease N-type but potentiates P-type  $Ca^{2+}$  current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron.* 10, 327-334.

Mohamedali, K. A., Kurz, L. C., Rudolph, F. B. (1996). Site directed mutagenesis of active site glutamate 217 in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry.* 35, 1672-1680.

Mommaas-Kienhuis, A. M., Nagelkerke, J. F., Vermeer, B. J., Daems, W. T., van Berkel, T. J. C. (1985). Visualization of the interaction of native and modified low density lipoproteins with isolated rat liver cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 38, 42-50.

Monier, S., Parton, R. G., Vogel, F., Benhlke, J., Henske, A., and Kurzchalia, T. V. (1995). VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 6, 911-915.

Monsma, F. J., McVittie, L. D., Gerfen, C. R., Mahan, L. C., Sibley, D. R. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature (Lond)*. **349**, 926-929.

Monsma, F. J., Mahan, L. C., Mc Vittie, L. D., Gerfen, C. R., Sibley, D. R. (1990). Molecular cloning and expresion of a dopamine receptor linked to adeny cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 6723-6727.

Montesano, R., Roth, J., Robert, A., Orci, L. (1982). Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature*. **296**, 651-653.

Morrison, M. E., Vijayasaradhi, D. E., Engelstein, D., Albino, A.P., and Houghton, A.N. (1993). A marker for neoplastic progression of human melanocytes is a cell surface ectopeptidase. *J. Exp. Med*. **177**, 1135-1141.

Munemura, M., Cote, T. E., Tsuruta, K., Eskay, R. L., Kebebian, J. W. (1980). The dopamine receptor in the intermediate lobe of the rat anterior pituitary gland: phramacological characterization. *Endocrinology*. **106**, 1676-1683.

Munshi, R. and Linden, J. (1989). Co-purification of A<sub>1</sub> adenosine receptors and gluanine nucleotide-binding proteins from bovine brain. *J. Biol. Chem*. **264**, 14853-14859.

Munshi, R. and Linden, J. (1990). Intercation of purified bovine A<sub>1</sub> adenosine receptor with guanine nucleotide-binding proteins of human platelet membranes folowwing reconstitution. *Mol. Pharmacol*. **38**, 170-176.

Munshi, R., Pang, I-H., Sternweis, P. C., Linden, J. (1991). A<sub>1</sub> adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, and G<sub>o</sub>. *J. Biol. Chem*. **266**, 22285-22289.

Murthy, K. S., and Makhlouf, G. M. (1995). Adenosine A<sub>1</sub> receptor-mediated activation of phospholipase C-β<sub>3</sub> in intestinal muscle: dual requirement of α and βγ subunits of G<sub>i3</sub>. *Mol. Pharmacol*. **47**, 1172-1179.

Nanoff, C., Waldhoer, M., Roka, F., Freissmuth, M. (1997). G protein coupling of the rat A<sub>1</sub>-adenosine receptor-partial purification of a protein which stabilizes the receptor G-protein complex. *Neuropharmacology*. **36**, 1211-1219.

Nakata, H. (1992). Affinity chromatography in purification of A<sub>1</sub> adenosine receptors. *J. Chromatography*. **597**, 335-343.

Nakamura, H., Koyama, G., Litaka, Y., Ohno, M., Yagisawa, N., Koudo, S., Maeda, K., Umezawa, H. (1974). Structure of coformycin, an unusual nucleoside of microbial origin. *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 4327-4328.

Nash, S. R., Godinot, N., Caron, M. G. (1993). Cloning and characterization of the opossum kidney cell D1 dopamine receptor: expression of identical D<sub>1A</sub> and D<sub>1B</sub> dopamine receptor mRNAs in opossum kidney and brain. *Mol. Pharmacol.* **44**, 918-925.

Nathke, I. S., Heuser, J., Lupas, A. (1992). Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. *Cell*. **68**, 899-910.

Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*. **80**, 249-257.

Neubert, R., Helge, H and Neubert, D. (1995). Thalidomide and the immune system. Down-regulation of the CD26 receptor, probably involved in the binding of HIV components of T cells in primates. *Life Science*. **56**, 407-420.

Ng, G. Y. K., Mouillac, B., George, S. R., Caron, M., Dennis, M., Bouvier, M., O'Dowd. (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 7-19.

Ng, G. Y. K., O'Dowd, B. F., Lee, S. P., Chung, H. T., Brann, M. R., Seeman, P., George, S. R. (1996). Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **227**, 200-204.

Nyce, J. W. (1999). Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. *Trends. Pharmacol. Sci.* **20**, 79-83.

O'Dowd, F. B., Hnatowich, M., caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Bouvier, R. J. (1989). Palmitoylation of the human  $\beta 2$  adrenergic receptor: mutation of CYS 314 in the carboxyl tail leads to an uncoupled, non-palmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569.

O'Dowd, F. B. (1993). Structures of dopamine receptors. *J. Neurochem.* **60**, 804-816.

Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., saito, T., Galluser, A., Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, **269**, 1872-1875.

Olah, M. E., Jacobson, K. A, Stiles, G. L. (1990). Purification and characterization of bovine cerebral cortex A1 adenosine receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 440-446.

Olah, M. E., Stiles, G. L. (1992). Adenosine receptors. *Ann. Rev. Physiol.* **54**, 211,225.

Oliver, C. (1982). Endocytic pathways at the lateral and basal cell surfaces of exocrine acinar cells. *J. Cell. Biol.* **95**, 154-161.

Olivera, A., and Lopez-Novoa, J. M. (1992a). Effect of adenosine and adenosine analogs on cyclic AMP accumulation in cultured mesangial cells and isolated glomeruli of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 341-346.

Olivera, A., Lopez-Rivas., Lopez-Novoa, J. M. (1992b). Adenosine stimulate  $Ca^{2+}$  fluxes and increases cytosolic free  $Ca^{2+}$  in cultured rat mesangial cells. *Biochem. J.* **282**, 871-876.

Onkubo, I., Huang, K., Ochiai, Y., Takagaki, M., Kazutaka, K. (1994). Dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA; identification of the NH2-terminal signal sequence at the membrane-anchoring domain. *J. Biol. Chem.* **264**, 3596-3601.

Oppenheimer-Marks, N., Ziff, M. (1988). Migration of lymphocytes through endothelial cells monolayers: augmentation by Interferon- $\gamma$ . *Cell Immunol.* **114**, 307-323.

Orci, L., Glick, B. S., Rothman, J. E. (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell.* **46**, 171-184.

Orozco, M., Canela, E. I., Franco, R. (1989). Theoretical study of the protonation and tautomerization of adenosine, formycin, and their 2-NH<sub>2</sub> and 2-F derivatives. Functional implications in the mechanism of reaction of adenosine deaminase. *Mol. Pharmacol.* **35**, 257-264.

Osses, N., Pearson, J. D., Yudilevich, D. L., Jarvis, S. M. (1996). Hypoxanthine enters human vascular endothelial cells (ECV 304) via the nitrobenzylthioinosine-insensitive equilibrative nucleoside transporter. *Biochem. J.* **317**, 843-848.

Ovchinnikov, Y. N., Abdulaev, N., Bogachuk, A. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated. *FEBS Lett.* **230**, 1-5.

Owen, D. J., Evans, P. R. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytic signals. *Science.* **282**, 1327-1332.

Ozaki, N., Moroi, K., Kadota, T., Suzuki, S., Kadota, K. (1994). Dopamine D1 and D2 receptors and their signal system present in coated vesicles prepared from bovine striatal tissue. *J. Neurochem.* **62**, 582-591.

Padua, R., Geiger, J. D., Danbock, S., Nagy, J. J. (1990). 2'-deoxycoformycin inhibition of adenosine deaminase in rat brain in vivo and in vitro analysis of specificity, potency and enzyme recovery. *J. Neurochem.* **54**, 1169-1178.

Page, E., Upshaw-Earley, J., Goings, G. E. (1994). Localization of atrial natriuretic peptide in caveolae in situ atrial myocytes. *Circ. Res.* **75**, 949-954.

Palmer, T. M., Stiles, G. L. (1997). Identification of an A<sub>2a</sub> adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term, desensitization. *Biochemistry*. **36**, 832-838.

Palmer, T. M., Gettys, T. W., Stiles, G. L. (1995). Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A<sub>3</sub> adenosine receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 16895-16902.

Pan, W. J., Osmanovic, S. S., Shefner, S. A. (1995). Characterization of the adenosine A<sub>1</sub> receptor-activated potassium current in rat locus ceruleus neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 537-544.

Paton, D. M., Kurahashi, K. (1981). Structure-activity relations for negative chronotropic action of adenosine in isolated rat atria: evidence for an action on A<sub>1</sub> receptors. *IRCS Med. Sci. Libr. Compend.* **9**, 447.

Parton, R. G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr Opin. Cell. Biol.* **8**, 542-548.

Pearse, B. M. (1989). Characterization of coated-vesicle adaptors: their reassembly with clathrin and with recycling receptors. *Methods. Cell. Biol.* **31**, 229-246.

Pedersen, U. B., Norby, B., Jensen, A.A., Schiodt, M., Hansen, A., Suhr-Jessen, P., Schideler, M., Thastrup, O., Andersen, P. H. (1994). Characteristic of stably expressed D<sub>1a</sub> and D<sub>1b</sub> receptors: atypical behaviour of the dopamine D<sub>1b</sub> receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 85-93.

Piazza, G., Callanan, H., Mowery, J., Hixson, D. (1989). Evidence for a role of dipeptidyl peptidase IV in fibronectin-mediated interactions of hepatocytes with extracellular matrix. *Biochem. J.* **262**, 327-334.

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

Piersen, C. E., True, C. D., Wells, J. N. (1994). A carboxyl-terminally truncated mutant and nonglycosylated A<sub>2a</sub> adenosine receptor retains ligand binding. *Mol. Pharmacol.* **45**, 861-870.

Pipping, S., Andexinger, S., Lohse, M. J. (1995). Sequestration and recycling of beta2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol. Pharmacol.* **47**, 666-676.

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

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

Peakman, M. C., and Hill, S. J. (1995). Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **115**, 801-810.

Pearson, J. D., Carleton, J. S., Gordon, J. L. (1980). Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.* **190**, 421-429.

Peters, K-R., Carley, W. W., Palade, G. E. (1985). Endothelial plasmalemmal vesicles have characteristics striped bipolar structures. *J. Cell. Biol.* **101**, 2233-2238.

Piguet, V., Chen, Y. L., Mangasarian, A., Foti, M., Carpentier, J. L., Trono, D. (1998). Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis; Nef connects CD4 with the  $\mu$  chain of adaptor complexes. *EMBO. J.* **17**, 2472-2481.

Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., Trono, D. (1999). The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruse: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* **168**, 51-63.

Poulsen, S. A., Quinn, R. J. (1998). Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 619-641.

Prasad, K., Barouch, W., Greene, L., Eisenberg, E., Knorr, R., Ungewickell, H., Ungewickell, E. (1994). Auxilin, a regulatory factor of dissociation and assembly of clathrin cages. *Mol. Biol. Cell.* **5**, 329.

Protasoni, G., Castoldi, G., Busca, G., Panzacchi, G., Genovesi, S., Golin, R., Stella, A. (1996). Effects of adenosine receptor agonist on renin release in anesthetized rats. *J. Hypertension.* **13**, 1753-1757.

Ralevic, V., Burnstock, G. (1998). Receptors for purine and pyrimidines. *Pharmacol. Review.* **50**, 413-492.

Ramkumar, V., Olah, M. E., Jacobson, K. A., Stiles, G. (1991). Distinct pathways of desensitization of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> adenosine receptors in DDT<sub>1</sub>MF-2. *Mol. Pharmacol.* **40**, 639-647.

Ramkumar, V., Stiles, G. L., Beaven, M. A., Ali, H. (1993). The A<sub>3</sub> adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 16887-16890.

Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the  $\beta$  chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO. J.* **17**, 2148-2155.

Raposo, G., Dunia, I., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S., Stroberg, A.D., Benedeth, E. L. and Hoebeke, J. (1987). Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. *Biol. Cell.* **60**, 117-124.

Raposo, G., Dunia, I., Delavier-Klutchko, C., Kaveri, S., Stroberg, A.D. and Benedeth, E. L. (1989). Internalization of beta-adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles. *Eur. J. Cell. Biol.* **50**, 340-352.

Redman, R. S., and Silinsky, E. M. (1994). ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings. *J. Physiol., London.* **447**, 117-127.



Ren, H., and Stiles, G. L. (1994a). Characterization of the human A1 adenosine receptor gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 3104-3110.

Ren, H., and Stiles, G. L. (1994b). Posttranscriptional mRNA processing as a mechanism for regulation of human a1 adenosine receptor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4864-4866.

Ren, H., and Stiles, G. L. (1995). Separate promoters in the human A1 adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology.* **135**, 2307-2313.

Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M. (1986). Adenosine receptors and calcium. Basis for proposing a third (A3) adenosine receptor. *Prog. Neurobiol.* **26**,179-209.

Ribeiro, J. A., Sebastiao, A. M. (1986). Further evidence for adenosine A3 receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**,13.

Richardson, P. J., Kase, H., Jenner, P. G. (1997). Adenosine A2A receptor antagonists a new agents for the treatment of Parkinson's disease. *TIPS.* **18**, 338-344

Riezamn, H., Woodman, P. G., van Mer, G., Marsh, M. (1997). Molecular mechanisms of endocytosis. *Cell.* **91**, 731-738.

Ritter, T. E., Fajardo, O., Matsue, H., Anderson, R. G., Lacey, S. W. (1995). Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 3824-3828.

Ritzel, M., Yao, S. Y. M., Huang, M-Y., Elliott, J. F., Cass, C. E., Young, J. D. (1997). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a human Na<sup>+</sup>-nucleoside cotransporter (hCNT1). *Am. J. Physiol.* **272**, C707-C714.

Rivkees, S. A, and Reppert, S. M. (1992). RFL9 encodes an A<sub>2b</sub>-adenosine receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1598-1604.

Rivkees, S. A(1994). Localization and characterization of adenosine receptor expression in rat testis. *Endocrinology.* **153**, 2307-2313.

Rivkees, S. A. (1995). Immunohistochemical detection of A<sub>1</sub> adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res.* **677**, 193-203.

Robinson, D. G., Depta, H. (1988). Coated vesicles. *Annu.Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **39**, 53-99.

Robbins, S. M., Quintrell, N. A., and Bishop, M. J. (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3507-3515.

Rodman, J. S., Mercer, R. W., Stahl, P. D. (1990). Endocytosis and transcytosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2**, 664-672.

Roethberg, K., Heusser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y-S., Glenney, J. R., Anderson, R. G. W. (1992). *Cell.* **68**, 673-682.

Roettger, B. F., Rentsch, R. U., Pinon, D., Holicky, E., Hadac, E., Larkin, J. M., Miller, L. J. (1995). Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* **128**.1029-1041.

Roth, N. S., Campbell, P. T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J, Lohse, M. J. (1991). Comparative rates of desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptors by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and the cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6201-6204.

Ruiz, A., Sanz, J. M., Gonzalez-Calero, G., Fernandez, M., Andrés, A., Cubero, A. And Ros, M. (1996). Desensitization and internalization of adenosine A<sub>1</sub> receptors in rat brain by in vivo treatment with R-PIA: involvement of coated vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1310**, 168-174.

Sandving, K., Olsness, S., Petersen, O. W., Van Deurs, B. (1987). Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J. Cell. Biol.* **105**, 679-689.

Santini, F., Keen, J. H. (1996). Endocytosis of activated receptors and clathrin coated pit formation. Deciphering the chicken egg relationship. *J. Cell. Biol.* 132, 1025-1036.

Sattin, A., and Rall, T. W. (1970). The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol. Pharmacol.* 6, 13-23.

Saura, C., Ciruela, F., Casadó V., Canela, E. I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R. (1996). Adenosine deaminase interacts with A<sub>1</sub> adenosine receptor in pig brain cortical membranes. *J. Neurochem.* 66, 1675-1682.

Saura, C., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., Franco, R. (1998). Adenosine deaminase and A<sub>1</sub> adenosine receptor are internalized together following agonist-induced receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 17610-17617

Sargiacomo, M., Sudol, m., Tang, Z. L., and Lisanti, M. P. (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK. *J Cell Biol.* 122, 789-807.

Schmid, S., Damke, H. (1995). Coated vesicles: a diversity of form and function. *FASEB. J.* 9, 1445-1453.

Schwabe, U., Kiffe, H., Ouchstein, C., Trost. (1979). Specific binding of [<sup>3</sup>H] adenosine to rat brain membranes. *Naunyn-Schmiederberg's Arch. Pharmacol.* 313, 179-187.

Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Corley-Mastick, C., and Lodish, H. F. (1994). Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell. Biol.* 127, 1233-1243.

Scherer, P. E., Tang, Z. L., Chun, M., sargiacomo, M., Lodish, H. F., and Lisanti, M. P. (1995). Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270, 16395-16401.

Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Lodish, H. F., Lisanti, M. P. (1996). Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 131-135.

Schiffman, S. N., Jacobs, O., Vanderhaeghen, J-J (1991). Striatal restricted adenosine A<sub>2</sub> receptor (RDC8) is expressed by enkephalin but not by substance P neurons: an in situ hybridization histochemistry study. *J. Neurochem.* **57**, 1062-1067.

Schmid, S. L. (1993). Toward a biochemical definition of the endosomal compartment. Studies using free flow electrophoresis. *Subcell. Biochem.* **19**, 128.

Schnitzer, JE. (1993). Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. *Cardiovasc. Med.* **2**, 124-130.

Schnitzer, JE., Oh, P., Pinney, E., Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell. Biol.* **127**, 1217-1232.

Scholz, K. P., Kohl, C., Neumann, J., Schmitz, W., Seeland, C., Stein, B. (1993). Inotropic actions of adenosine derivatives in the mammalian heart. *Drug. Dev. Res.* **28**, 277-282.

Schrader, W. P., Stacy, A.R., Pollara, B (1979). Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity. Chromatography. *J. Biol. Chem.* **251**, 4026-4032.

Schrader, W. P., West, C. A., Strominger, N. L. (1987). Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit brain. *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 443-451.

Schrader, W. P., West, C. A., Miczek, A. D., Norton, E. K. (1990). Characterization of the adenosine deaminase-adenosine deaminase complexing protein binding reaction. *J. Biol. Chem.* **265**, 19312-19318.

Schrader, W. P., West, C. A., Rudofsky, U. H., Samsonoff, W. A. (1994). Subcellular distribution of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit kidney. Implication for adenosine metabolism. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 775-782.

Seaman, M. N. J., Burd, C. G., Emr, S. D. (1996). Receptor signalling and the regulation of endocytic membrane transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 549-556.

Seeman, P., and Van Tol, H. H. M. (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends. Pharmacol. Sci.* **15**, 264-270.

Severs NJ.(1988). Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact? *J Cell Sci.* **90**, 341-348.

Shaul, P. W., Smart, E. J. Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G. W. Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* **271**, 6518-6522.

Shockley, M. S., Burford, N. T., Sadeé, W., Lamah, J. (1997). *J. Neurochem.* **68**, 601-609.

Showalter, H. D. H., Putt, S. R., Borondy, P. E., Shillis, J. L. (1983). Adenosine-deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of (+/-)-3, 6, 7, 8-tetrahydro-3-((2-hydroxyethyl)methyl)imidazo (4, 5-D) (1, 3) diazepin(-OL) and some selected C-5 homologs of pentostatin. *J. Med. Chem.* **26**, 1478-1482.

Shpetner, H. S., Vallee, r. B. (1992). Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature.* **355**, 733-735.

Sibley, D. R., Strasser, R. H., Benovic, J. L., Daniel, K., Lefkowitz, R. J. (1986). Phosphorylation/dephosphorylation of the  $\beta$ -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 9408-9412.

Sideraki, V., Mohamedali, K. A., Wilson, D. K., Chang, Z. Y., Kellems, R. E., Quiocho, F. A., Rudolph, F. B. (1996). Probing the functional role of 2 conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase. *Biochemistry.* **35**, 7862-7872.

Sidhu, A., Sullivan, M., Kohout, T., Balen, P., Fishman, P. H. (1991). D1 dopamine receptors can interact with both stimulatory and inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *J. Neurochem.* **57**, 1445-1451.

Simionescu, N., Simionescu, M., Palade, G. E. (1972). J. Cell. Biol. Permeability of intestinal capillaries. Pathway followed by dextrans and glycogens. *J. Cell. Biol.* **53**, 365-392

Simon, K., Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569-572.

Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J-M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B-H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI (3)K function to Rab5regulation of endosome fusion. *Nature.* **394**, 494-498.

Smart, E. J., Ying, Y.-S., and Anderson, R. G. W. (1995) Hormonal regulation of caveolae internalization. *J. Cell. Biol.* **131**, 929-938.

Smart, E. J., Ying, Y. S., Mineo, C., and Anderson, R. G. W. (1995). A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *PNAS.* **92**, 10104-10108.

Smith TM, Kirley TL. (1998a). Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-ATPase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-ATPases1. *Biochim Biophys Acta.* **386**. 65-78.

Smith TM, Carl SA, Kirley TL. (1998b). Immunological detection of ecto-ATPase in chicken and rat tissues: characterization, distribution, and a cautionary note. *Biochem Mol Biol Int.* **45**, 1057-1066 .

Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall DP, Kennedy C. (1999). Modulation of purinergic neurotransmission. *Prog Brain Res* **120**, 11-20.

Sokolov, P., Giros, B., Martres, M. P., Barthenet, M. L., Schwartz, J. C. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D-3) as a target for neuroleptics. *Nature*, **347**, 146-151.

Sorkin, A., Waters, C. M. (1993). Endocytosis of growth factor receptors. *Bioessays*. **15**, 375-382.

Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J. Biol. Chem.* **271**, 9690-9697.

Sosa, M. A., Schmidt, B., von Figura, K., Hille-Rehfeld, A. (1993). In vitro binding of plasma membrane coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domains of lysosomal acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12537-12543.

Spano, P. F., Govoni, S., Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **19**, 155-165.

Spencer, N., Hopkinson, D. A., Harris, H. (1968). Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* **32**, 9-14.

Spielman, W. S., and Arend, L. J. (1991). Adenosine receptors and signalling in the kidney. *Hypertension*. **17**. 117-130.

Spring, D. J. and Neer, E. J. (1994). A 14-amino acid region of the G protein  $\gamma$  subunit is sufficient to confer selectivity of  $\gamma$  binding to the  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 22882-22886.

Springer, T. A (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **263**, 502-508.

Stahelin, M and Simons, P. (1982). Rapid and reversible disappearance of  $\beta$ -adrenergic cell surface receptors. *EMBO. J.* **1**, 187-190.

Stiles, G. L. (1992). Adenosine receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 6451-6454.

Strader, C. D., Sigals, I. S., Balke, A. D., Cheung, A. H., Register, R. B., Rands, E., Zemcik, B. A., Candelore, M. R., Dixon, R. A. F. (1987). The carboxyl

terminus of the hamster  $\beta$ -adrenergic receptor expressed in mouse L cells is not required for receptor sequestration. *Cell*. **49**, 855-863.

Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S., Dixon, R. A. F. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13478-13572.

Strader, C. D., Sigal, I. S., Candelore, M. R., Rouds, E., Hills, W. S., Dixon, R. A. F. (1988). Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the  $\beta$ -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* **263**, 10267-10271

Stehle, J. H., Rivkees, S. A., Lee, J. J., Weaver, D. R., Deeds, J. D., Reppert, S. M. (1992). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol. Endocrinol.* **6**, 384-393.

Stein, H., Schwarting, R.; Niedobitek, G. (1989). In : *Leukocyte typing IV*. Pp 412-415. (Eds. Knapp, W; Dörken, B; Gilks, W.R.) Oxford University Press.

Stiles, G. L. (1986). Photoaffinity cross-linked A1 adenosine receptor-binding subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 10839-10843.

Sugamori, K. S., Demchyshyn, L. L., Chung, M., Niznik, H. B. (1994). D1a, D1b, and D1c dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10536-10540.

Sunahara, R. K., Niznik, H. B., Weiner, D. M., Stormann, T. M., Brann, M. R., Kennedy, J. L., Gelernter, J. E., Rozmahel, R., Yang, Y. L., Israel, Y., Seeman, P., O'Dowd, B. F. (1990). Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature. (Lond)*. **347**, 80-83.

Sunahara, R. K., Guan, H. C., O'Dowd, B. F., Seeman, P., Laurier, L. G., Ng, G., George, S. R., Torchia, J., van Tol, H., Niznik, H. B. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature (Lond)*. **350**, 614-619.



Surmeier, D. J., Bargas, J., Hemmings, H. C., Nairn, A. C., Greengard, P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* **14**, 385-397.

Tanaka, T; Camerini, D; Seed, B; Torimoto, Y; Dang, N. H; Kameoka, J; Dahlberk, H. N., Schlossman, S. F., Morimoto, C. (1992). Clonig and functional expression of the cell activation antigen CD26. *J. Immunol.* **149** 481-486.

Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F., lisanti, M. P. (1996). Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* **271**, 2255-2261.

Takel, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., De Camilli, P. (1995). *Nature.* **374**, 190-192.

Thorn, J. A., and Jarvis, S.M. (1996). Adenosine transporters. *Gen Pharmac.* **27**, 613-620.

Tiberi, M., and Caron, M. G. (1994). High agonist-independent activity is a distinguishing feature of the dopamine D<sub>1B</sub> receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **269**, 27925-27931.

Tiberi, M., Jarvie, K. R., Silvia, C., Falardeau, P., Gingrich, J. A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T. L., Freneau, R. T., Caron, M. G. (1991). Cloning molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second rat brain compared with the D<sub>1B</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7491-7495.

Tiruppathi, C., Miyamoti, Y., Ganapathy, V., Roesel, R. A., Whitford, G. M., and Leibach, F. H. (1990). Hydrolysis and transport of proline-containing peptides in renal brush-border membrane vesicles from dipeptidyl peptidase IV-positive and dipeptidyl peptidase IV-negative rat strains. *J. Biol. Chem.* **265**, 1476.

Tischfield, J. A., Creagan, R. P., Nichols, E. A., Ruddle, F. H. (1974). Assignment of a gene for adenosine deaminase to human chromosome 20. *Hum. Hered.* **24**, 1-11.

Tokunaga, T., Katsuragi, T., Sato, C., Furukawa, T. (1995). ATP release evoked by isoprenaline from adrenergic nerves of guinea pig atrium. *Neurosci. Lett.* **186**, 95-98.

Tolbert, L. M and Lameh, J. (1996). Human muscarinic Cholinergic receptor Hm1 internalizes via clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **271**, 17335-17342  
Torimoto, Y., Dang, N. H., Vivier, E., Tanaka, t., Schlossman, S. F., and Morimoto, C. J. (1991). Coassociation of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) with CD45 on the surface of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**, 2514-2517.

Torimoto, Y., Dang, N.H., Vivier, E., Tanaka, D., Schlossman, S.F., Morimoto, C. (1991) Coassociation of CD26 (Dipetpidyl peptidase IV) witz CD45 on the sulface og human liymphocytes T. *J.Immunol.* **147**, 2514-2517.

Trotta, P.P., Peterfreund, R. A., Schonberg, R., Balis, M.E. (1979). Rabbit adenosine deaminase conversion proteins. Purifiaction and characterization. *Biochemistry.* **18**, 2953-2959.

Trotta, P.P.(1982) Identification of a membrane adenosine deaminase binding protein from human placenta. *Biochemistry.* **21** 4014-4023.

Trowbridge, I. S. (1991). Endocytosis and signals for internalization. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **3**, 634-641.

Trussel, L. O., and Jackson, M.B. (1985). Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4857-4861.

Tran, D., Carpentier, J-L., Sawano, F., Gorden, P., Orci, L. (1987). Ligands internalized through coated or non-coated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 7957-7961.

Tucker, A. L., Linden, J., (1993). Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovascular Res.* **27**, 62-67.

Ugerer, J. P. J., Oosthuizen, H. M., Bissbort, S.H., Vermaak, W. J. H. (1992). Serum adenosine deaminase: isoenzymes and diagnostic application. *Clin. Chem.* **38**, 1322-1326.

Undie, A. S., Friedman, E. (1990). Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 987-992.

Undie, A. S., Weinstock, J., Sarau, H. M., Friedman, E. (1994). Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J. Neurochem.* **62**, 2045-2048.

Valenzuela, A., Blanco, J., Callebaut, C., Jacotot, E., Lluís, C., Hovanessian, A. G., Franco, R. (1997). Adenosine deaminase binding to human CD26 is inhibited by HIV-1 envelope glycoprotein gp120 and viral particles. *J. Immunol.* **158**, 3721-3729.

Van Calker, D., Muller, M., Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* **33**, 999-1005.

Van Galen, P. J., Van Bergen, A. H., Gallo-Rodriguez, C., Melman, N., Olah, M. E., Izjerman, A. P., Stiles, G. L. (1994). A binding site model and structure-activity relationships for the rat A3 adenosine receptor. *Mol. Pharmacol.* **45**, 1101-1111.

Van der Weyden, M. B., Kelley, W. N. (1976). Human adenosine deaminase distribution and properties. *J. Biol. Chem.* **251**, 5448-5456.

Van der Ploeg, I., Parkinson, F. E., Fredholm, B. B. (1992). The effect of pertussis toxin on radioligand binding to rat brain adenosine A1 receptors. *J. Neurochem.* **58**, 1221-1229.

Van Deurs, B. And Nilausen, K. (1982). Pinocytosis in mouse L- fibroblasts: ultrastructural evidence for a direct membrane shuttle between the plasma membrane and the lysosomal compartment. *J. Cell. Biol.* **94**, 279-286.

Van Deurs, B., Hansen S. H., Petersen O. W., Melby E. L., Sandving, K. (1990). Endocytosis, intracellular transport and transcytosis of the toxic protein ricin by a polarized epithelium. *Eur. J. Cell. Biol.* **51**, 96-109.

Van Galen, P. J. M., Van Vlijmen, H. W. T., Ijzeman, A. P., Soudjin, W. (1990). A model for the antagonist binding site on the adenosine A1 receptor, based on steric, electrostatic and hidrophobic properties. *J. Med. Chem.* **33**, 1708-1713.

Vargeese, C., Sarma, M. S. P., Pragnacharyulu, P. V. P. Abushanab, E., Li, S. Y., Stoeckler, J. D. (1997). Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of putative metabolites of (+)-erithro-9-(2S-hidroxy-3R-nonyl)adenine. *J. Med. Chem.* **37**, 3844-3849.

Vendite, D., Sanz, J. M., Lopez-Alañón, D. M., Vacas, J., Andrés, A., Ros, M. (1998). Desensitization of adenosine A1 receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase in cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* **23**, 211-218.

Villalba, M., Martínez-Serrano, A., Gómez-Puertas, P., Blanco, P., Börner, C., Villa, A., Casado, M., Jiménez, E., Pereira, R., Bogonez, E., Pozzan, T., Satrústegui. (1994). The role of pyruvate in neuronal calcium homeostasis. Effects on intracellular calcium pools. *J. Biol. Chem.* **264**, 2468-2476.

Von Kügelgen, I., Aligater, C., Schobert, A., Starke, K. (1994). Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neuroscience.* **61**, 199-202.

Von Zastrow, M., and Kobilka, B. K. (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta_2$ -adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **267**, 3530-3538.

Wang, J., Su, S-F., Dresser, M. J., Schaner, M. E., Washington, C. B., Giacomini, K. M. Na<sup>+</sup>-dependent purine nucleoside transporter from human kidney: cloning and functional characterization. *Am. J. Physiol.* **273**, F1058-F1065.

Wang, H-Y., Undie, A. S., Friedman, E. (1995). Evidences coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol. Pharmacol.* **48**, 988-994.

Wang, J., Zheng, J., Anderson, J. L., Toews, M. L. (1997). A mutation in the hamster  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor that differentiates two steps in the pathway of receptor internalization. *Mol. Pharmacol.* **52**, 306-313.

Way, M., Parton, R. G. M- caveolin, a muscle-specific caveolin related protein. *FEBS Letts.* **376**, 108-112.

Weinberg, J. M., Davis, J. A., Shayman, J. A., Knight, P. R. (1989). Alterations of cytosolic calcium in LL-PK<sub>1</sub> cells induced by vasopressin and exogenous purines. *Am. J. Physiol.* **256**, C967-C976.

Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H., Seeman, P., O'dowd, B. F., Brann, M. R. (1991). Dopamine D1 and D2 receptor mRNA expression in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 1895-1863.

Weinshank, R. L., Adham, N., Macchini, M., Olsen, M. A., Branchek, T. A., Harting, P. R. (1991). Molecular cloning and characterization of a high affinity dopamine receptor (D<sub>1B</sub>) and its pseudogene. *J. Biol. Chem.* **266**, 22427-22435.

White, T. D., Bourke, J. E., Livett, B. G. (1987). Direct and continuous detection of ATP secretion from primary monolayer cultures of bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurochem.* **49**, 1266-1273.

White, T. E., Dickenson, J. M., Alexander, S. P. H. Hill, S. J. (1992). Adenosine A1-receptor stimulation of inositol phospholipid hydrolysis and calcium mobilisation in DDT<sub>1</sub> MF-2 cells. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 215-221.

White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M., Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA<sub>B</sub> receptor. *Nature.* **396**, 679-682.

Wiginton, D. A., Kaplan, D. J., States, J. C., Akeson, A. L., Perme, C. M., Bilyk, I. J., Vaughn, A. J., Lattier, D. L., Hutton, J. J. (1986). Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. *Biochemistry.* **25**, 8234-8244.

Willardson, B. M., Pou, B., Yoshida, T., Bitensky, M. W. (1993). Cooperative binding of the retinal rod G-protein, transducing, to light-activated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **269**, 6371-6382.

Williams, T. C., Doherty, A. J., Griffith, D. A., Jarvis, S. M. (1989). Characterization of sodium-dependent and sodium-independent nucleoside transport systems in rabbit brush-border and basolateral plasma-membrane vesicles from the renal outer cortex. *Biochem. J.* **264**, 223-331.

Williams, T. C., and Jarvis, S. M. (1991). Multiple sodium-dependent nucleoside transport system in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochem. J.* **274**, 27-33.

Wilson, D. K., Rudolph, F. B., Quioco, F. A. (1991). Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-stage analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science.* **252**, 1278-1284.

Wilson, D. K., and Quioco, F. A. (1993). A pre-transition -state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochemistry.* **32**, 1689-1694.

Windscheif, U. (1996). Purinoreceptors: from history to recent progress. A review. *J. Pharmacol.* **48**, 993-1011.

Wolfenden, R., Frick, L. (1986). Mechanisms of enzyme action and inhibition-transition-state analogs for acid-base catalysis. *J. Prot. Chem.* **5**, 147-155.

Wu, P. H., and Phillips, J. W. (1978). Distribution and release of adenosine triphosphate in rat brain. *Neurochem. Res.* **3**, 563-571.

Wu, G., Krupnick, J. G., Benovic, J. L., Lanier, S. M. (1997). Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and  $\alpha_2$ -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 17836-17842.

Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Ritzel, M. W. L., Gati, W. P., Cass, C. E., Young, J. D. (1996). Transport of adenosine by recombinant purine- and pyrimidine-selective sodium/nucleoside cotransporter from rat jejunum expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1529-1535.

Yao, S. Y. M., Ng, A. M. L., Muzyka, W. R., Griffiths, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., Young, J. D. (1998). Molecular cloning and functional characterization of nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive (es) and NBMPR-insensitive (ei) equilibrative nucleoside transporter proteins (rENT1 and rENT2) from rat tissues. *J. Biol. Chem.* **272**, 28423-28430.

Yamaguchi, I. P., Jose, P. A., Mouradian, M. M., Canessa, L. M., Monsma, F., Sibley, D. R. Jr., Takeyasu, K., Felder, R. A. (1993). Expression of dopamine D1A receptor gene in proximal tubule of rat kidneys. *Am. J. Physiol.* **264** (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.* **33**): F280-F285.

Yamane, H. K., and Fung, B. K-K. (1993). Covalent modification of G-proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Sci.* **32**, 201-241.

Yang-Feng, T. L., Xue, F., Zhong, W., Cotecchia, S., Frielle, T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. L. (1990). Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **8**, 1516-1520.

Yaron, A., and Naider, F. (1993). Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 31-81.

Yeung, C-Y., Ingolia, D. E., Roth, D. B., Shoemaker, C., Al-Ubaidi, M. R., Yen, J-Y., Ching, C., Bobonis, C., Kaufman, R. J., Kellems, R. E. (1985). Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 10299-10307

Ying, Y-S., Anderson, R. G. W., Roethberg, K. G. (1992). Each caveolae contains multiple glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane proteins. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **57**, 593-604.

Yu, S. S., Lefkowitz, R. J., Hausdorff, W. P. (1993).  $\beta$ -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* **268**, 337-341.

Yu, P. Y., Eisner, G. M., Yamaguchi, I., Mouradian, M. M., Felder, R. A., Jose, P. A. (1996). Dopamine D1A receptor regulation of phospholipase C isoforms. *J. Biol. Chem.* **271**, 19503-19508.









