

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUIMICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIS MOLECULAR

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

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica **Silvia Ginés Padrós** para optar al grado de Doctora en Bioquímica.


Silvia Ginés Padrós

Esta Tesis se ha inscrito dentro del programa de doctorado de Bioquímica y Biología Molecular, bienio 1995-1997, de la Universitat de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Silvia Ginés Padrós bajo la dirección de las Dras. Carme Lluís y Josefa Mallol en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Gener 2000.



Carme Lluís



Josefa Mallol

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. LA ADENOSINA COMO REGULADOR FISIOLÓGICO.....	1
1.2. RECEPTORES DE ADENOSINA.....	5
1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA.....	5
1.2.2. RECEPTORES A ₁ DE ADENOSINA.....	9
1.2.2.1. Caracterización molecular de los receptores A ₁	9
1.2.2.2. El gen que codifica para el receptor A ₁	13
1.2.2.3. Agonistas y antagonistas del receptor A ₁	14
1.2.2.4. Distribución tisular y efectos fisiológicos de la adenosina mediados por el receptor A ₁	18
1.2.2.5. Transducción de la señal a través del receptor A ₁	20
1.2.3. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL.....	25
1.2.3.1. Secuestro y <i>Down regulation</i> de receptores acoplados a proteínas G. Vesículas de endocitosis.....	25
1.2.3.2. Endocitosis del receptor A ₁ de adenosina.....	39
1.3. ADENOSINA DESAMINASA.....	39
1.3.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CINÉTICA DE LA ADENOSINA DESAMINASA.....	40
1.3.2. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LA ADENOSINA DESAMINASA. ECTO-ADENOSINA DESAMINASA.....	42
1.3.3. PROTEÍNAS DE UNIÓN DE LA ECTO-ADA: CD26 Y RECEPTORES RECEPTORES A ₁ DE ADENOSINA.....	43
1.3.3.1. El CD26 como molécula de unión de la ecto-ADA.....	44
1.3.3.2. El CD26 como molécula de adhesión.....	45
1.3.3.3. El receptor A ₁ de adenosina como proteína de anclaje de la ecto-ADA. Implicación de la ecto-ADA como modulador del receptor A ₁ de adenosina.....	46
1.4. RECEPTORES DE DOPAMINA.....	48
1.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CLASIFICACIÓN.....	49
1.4.2. RECEPTORES DE TIPO D ₁	55
1.4.2.1. Caracterización molecular y distribución de los receptores de tipo D ₁	55
1.4.2.2. Transducción de la señal de los receptores de tipo D ₁	57
1.4.3. REGULACION DEL RECEPTOR D ₁ DE DOPAMINA.....	60
1.5. CODISTRIBUCIÓN E INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS RECEPTORES DE DOPAMINA Y LOS RECEPTORES DE ADENO-	

SINA EN EL CEREBRO.....	62
2-OBJETIVOS.....	65
3-MATERIALES Y MÉTODOS.....	I
3-RESULTADOS.....	68
3.1.EL RECEPTOR A1 DE ADENOSINA Y LA ADENOSINA DESAMINASA SON SECUESTRADOS E INTERNALIZADOS EN CAVEOLAS TRAS LA ESTIMULACIÓN CON EL AGONISTA R-PIA.....	68
3.2.LOS RECEPTORES A1 DE ADENOSINA Y LOS RECEPTORES D1 DOPAMINA FORMAN HETEROMEROS FUNCIONALES. DISTRIBUCION DE LA ADENOSINA DESAMINASA EN ESTOS COMPLEJOS RECEPTOR-RECEPTOR.....	83
3.3. LA ADHESION ESTA REGULADA POR LA INTERACCION ENTRE LA ADENOSINA DESAMINASA DE LA SUPERFICIE PRESENTE EN CELULAS CACO-2 Y EL CD26 EXPRESADO EN LINFOCITOS T.....	108
4-DISCUSSION.....	123
5-CONCLUSIONES.....	134
6-BIBLIOGRAFIA.....	136

INTRODUCCION

1.1. LA ADENOSINA COMO REGULADOR FISIOLÓGICO.

La adenosina y sus derivados juegan un papel crucial en el funcionamiento celular al ser intermediarios de rutas metabólicas y, al mismo tiempo, actuar como la principal fuente de energía celular (ATP). Además, forman parte de los cofactores necesarios para diversas reacciones enzimáticas tales como las reacciones de oxidación-reducción (deshidrogenasas dependientes de NAD^+ , NADP^+ , FAD) y las reacciones de metilación en las que participan como dadores de grupos metilos (S-adenosilmetionina o SAM) (Arch et al, 1978) y también pueden actuar directamente como segundos mensajeros (AMPc y ADPRc). Cabe destacar su importancia como constituyente de los ácidos nucleicos responsables de la síntesis proteica y el almacenamiento de la información genética (DNA y RNA).

Además de su papel en el metabolismo celular, los nucleótidos y nucleósidos purínicos, ATP, ADP, diadenosina polifosfatos, y adenosina, ejercen su función reguladora a través de receptores específicos de membrana, mediante los cuales participan en gran número de procesos fisiológicos y patológicos. En el año 1972 Burnstock, propuso la existencia de un nervio purinérgico (no adrenérgico, no colinérgico) que utiliza el ATP como neurotransmisor, actuando a través de sus receptores purinérgicos. Este mismo autor puso de manifiesto la existencia de dos tipos de receptores purinérgicos molecularmente distintos: Los receptores de adenosina (P_1) y los receptores de ATP (P_2). La presencia de receptores purinérgicos en la membrana plasmática celular, sugiere la idea que deben existir mecanismos capaces de generar purinas y/o sus derivados en el espacio extracelular y que éste debe ser un proceso regulado.

La adenosina se encuentra tanto en el medio intracelular como en el medio extracelular siendo su concentración, en ambos compartimentos la resultante del balance entre su degradación y su síntesis (Figura 1; Thorn and Jarvis, 1996). Ambos reservorios de adenosina son totalmente intercambiables mediante transportadores específicos de nucleósidos que transfieren la adenosina a ambos lados de la membrana celular.

Las dos vías principales para la producción de adenosina en el citoplasma celular son la defosforilación del AMP por la 5'-nucleotidasa y la hidrólisis de la S-adenilhomocisteína (SAH) por la S-adenilhomocisteína hidrolasa (SAHH). La producción relativa de adenosina por cada una de estas vías depende del estado energético de la célula. En condiciones normales, es esta

segunda vía la fuente principal de generación de adenosina (Lloyd y Schrader, 1987). Sin embargo, cuando se produce un desequilibrio entre la demanda y el aporte energético, como sucede en los estados de hipoxia o ante aumentos del consumo energético, la adenosina se forma rápidamente por defosforilación consecutiva de los nucleótidos ATP, ADP y AMP con el concurso, en último término, de la 5'-nucleotidasa citosólica. (Meghi, 1993).

Las vías encargadas de la degradación de la adenosina intracelular, implican su fosforilación a AMP por la adenosina quinasa o su desaminación a inosina por la adenosina desaminasa citosólica (ADA). En general, la fosforilación es la principal vía de desaparición de adenosina intracelular (Gu and Geiger, 1992) pero, ante situaciones de hipoxia en las que su concentración es muy elevada, básicamente la adenosina se desamina (Fisher and Newsholme, 1984).

El principal mecanismo de obtención de adenosina extracelular es la degradación de los nucleótidos que se liberan al medio extracelular provenientes de la misma célula o de células vecinas, sin olvidar el transporte desde el citosol cuando la producción de adenosina intracelular es alta. En el cerebro (Wu and Phillis, 1978; Fiedler, 1992; Tokunaga et al, 1995), en las células cromafines adrenales (White et al, 1987), en el vaso deferente (Drake and Petersen, 1992) y en las uniones neuromusculares (Redman and Silinsky, 1994), el ATP es almacenado y liberado en vesículas de secreción junto con neurotransmisores clásicos, como la acetilcolina o las catecolaminas. Además, en otras células en las que se encuentran las células activadas neuronalmente, como las de musculatura lisa (Von Kügelgen et al, 1994) o estriada (Cunha and Sebastiao, 1993), el ATP se libera mediante canales de membrana que actúan como transportadores de ATP. En la degradación del ATP y de los otros nucleósidos de adenina está implicada la actividad de varios ecto-enzimas que, genéricamente se conocen como ecto-nucleotidasas (Gordon et al, 1989; Zimmerman, 1996). Así se han encontrado ecto-ATPasas, ecto-adenosina difosfatasa y ecto-5'-nucleotidasas asociadas a membrana plasmática de diversos tipos celulares (Pearson et al, 1980; Mateo et al, 1999; Sneddon et al, 1999; Smith 1998a, 1998b).

La adenosina producida por acción de la ecto-5'-nucleotidasa exportada al compartimento extracelular puede ser desaminada a inosina mediante la acción de la ecto-adenosina desaminasa (ecto-ADA), la cual se ha encontrado en cerebro de rata (Centelles et al, 1986), en células sanguíneas (Franco et al, 1990; Aran et al, 1991), en túbulo proximal de riñón (Blanco et al, 1993; Scharder et al, 1994) y en corazón (Meghji et al, 1988). Sin embargo, no se ha encontrado actividad adenosina quinasa extracelular con lo que la ecto-ADA, se

convierte en el único enzima capaz de degradar la adenosina extracelular y, en colaboración con el transportador nucleosídico, representan los sistemas responsables de disminuir la concentración extracelular de adenosina.

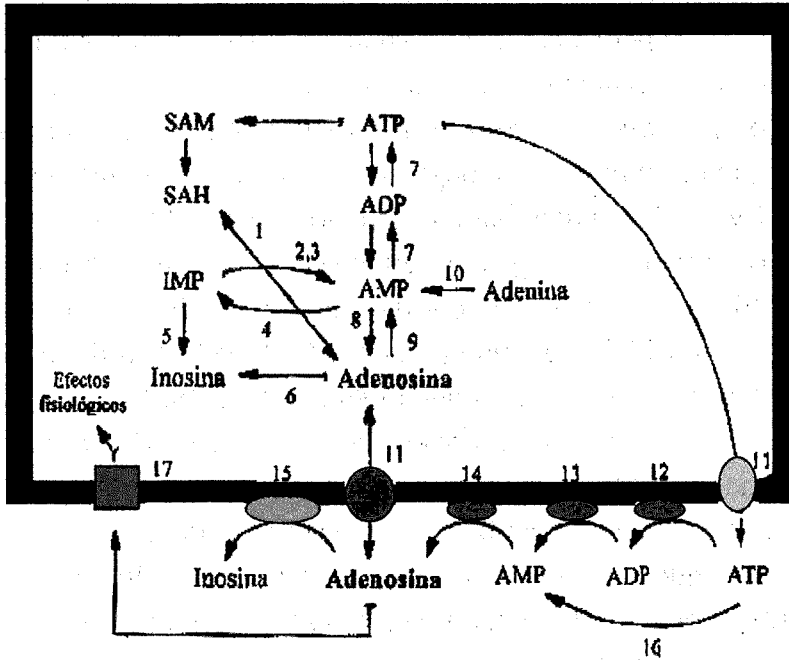


Figura 1. Producción y eliminación de la adenosina.

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

La adenosina, por su naturaleza hidrofílica, necesita sistemas de transporte especializados para atravesar la membrana celular. Existen transportadores nucleosídicos en gran variedad de tejidos y especies que tienen como finalidad regular los niveles plasmáticos y extracelulares de adenosina, lo que a su vez,

es importante para modular los efectos de la adenosina a través de sus receptores de membrana. Una prueba de ello es que la inhibición de los transportadores potencia la acción que la adenosina y sus análogos estructurales ejercen vía sus receptores (Baer and Vriend, 1984; Jarvis, 1988; Geiger and Fyda, 1991).

El intercambio de adenosina entre el citoplasma y el medio extracelular, está mediado por los transportadores nucleosídicos equilibrativos (o de difusión facilitada) y/o los transportadores nucleosídicos concentrativos Na^+ -dependientes. Los primeros, transportan bidireccionalmente nucleósidos, tanto purínicos como pirimidínicos, con baja o moderada afinidad mientras que el transporte activo de nucleósidos Na^+ -dependiente es unidireccional, concentrativo e implica un gasto energético. Este sistema transporta nucleósidos al interior celular en contra de su gradiente de concentración juntamente con el ion Na^+ o K^+ (Plagemann et al, 1988; Williams et al, 1989; Williams and Jarvis, 1991 y revisado por Cass et al, 1998; Baldwin et al, 1999)

Existen dos tipos de transportadores equilibrativos diferenciados por su distinta sensibilidad al inhibidor nitrobenziltioinosina (NBMPR). Así, se habla del transportador *es* que se inhibe por NBMPR (equilibrativo, sensible) y el transportador *ei* que no se inhibe por NBMPR (equilibrativo, insensible). Ambos presentan especificidad para pirimidinas y purinas, incluyendo la inosina, pero además el transportador equilibrativo *ei* puede transportar bases de purina como la hipoxantina (Cass et al, 1998; Crawford et al, 1998, Osses et al, 1996). Durante los dos últimos años los primeros ejemplos de transportadores *es* y *ei* han sido identificados y clonados en humanos y rata. Yao et al, en yeyuno de rata y Griffiths et al en placenta humana clonaron en 1997 el transportador equilibrativo *es*, designándolo como rENT1 y hENT1 respectivamente. El mismo año Yao et al clonaron el transportador equilibrativo *ei* en rata (rENT2) y en 1998 Crawford et al y Griffiths et al clonaron el transportador en humanos (hENT2). Estos transportadores expresados en *Xenopus* u otras células de mamíferos muestran las mismas propiedades cinéticas que los transportadores *es* y *ei* "in vivo". El transportador ENT1 humano se expresa en distintos tejidos incluyendo eritrocitos, placenta, cerebro, corazón, hígado, intestino y colon (Cass et al, 1998), mientras que el transportador ENT2 si bien también se expresa en diferentes tejidos se localiza preferentemente en músculo esquelético. El cDNA de ambos transportadores codifica para una glicoproteína de 456 aminoácidos con un 50 % de identidad entre ambos transportadores. Los transportadores ENT en mamíferos presentan 11 α -hélices hidrofóbicas transmembrana, un bucle

extracelular que conecta las hélices 1 y 2; esta última probablemente glicosilada y un gran bucle hidrofílico en la cara citosólica que conecta las hélices transmembrana 6 y 7. (Cass et al, 1998, Griffiths et al, 1997). Los primeros ejemplos de transportadores nucleosídicos Na^+ -dependientes en mamíferos han sido identificados en tejidos de rata por clonaje. El primero en ser identificado fue el rCNT1 en yeyuno de rata (Huang et al, 1994) y posteriormente en hígado (SPNT o rCNT2) (Che et al, 1995; Yao et al, 1996). En virtud de su homología con los transportadores de rata se han identificado recientemente en intestino e hígado humano ambos transportadores (Ritzel et al, 1997; Wang et al, 1997). Los transportadores CNT1 de mamíferos tienen 650 residuos aproximadamente y exhiben un 64 % de identidad de secuencia con los transportadores CNT2 (660 residuos). La topología de estos transportadores todavía no está clara. Se ha demostrado la glicosilación de la cola hidrofílica C-tal y la localización citoplasmática de su extremo N-tal (Hamilton et al, 1996) además, la existencia de 13 segmentos hidrofóbicos sugiere que esta proteína podría atravesar 13 veces la membrana en forma de α -hélices (Wang et al, 1997). Hasta el momento los transportadores nucleosídicos conjuntamente con la 5'-ectonucleotidasa y la ecto-adenosina desaminasa son las proteínas responsables de regular la concentración de adenosina extracelular y por lo tanto de modular la función de este nucleósido como autocoide.

1. 2. RECEPTORES DE ADENOSINA.

La mayor parte de los efectos producidos por la adenosina se deben a la interacción con sus receptores de membrana denominados receptores purinérgicos P_1 . Estos receptores, pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Ante la naturaleza tan diversa de los efectos producidos por la adenosina, parece obvio suponer que existan diversos subtipos de receptores acoplados a distintas señales intracelulares.

1.2. 1. CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA.

Los receptores de adenosina han sido clasificados en cuatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 según el orden de potencia en la unión de ligandos y la señal desencadenada tras su activación. La clonación de estos receptores ha

permitido ahondar en el conocimiento de su estructura, facilitando su clasificación y el estudio de su función y regulación. Un resumen de la investigación realizada en este campo en la última década lo constituyen las revisiones de Nyce, 1999; Ralevic et al, 1998; Khakh et al, 1998; Abbracchio et al, 1998; Poulsen et al, 1998.

Inicialmente al descubrirse el segundo mensajero AMPc, se identificó a la adenosina como un agente de efecto dual sobre la actividad de la adenilato ciclasa, produciendo bien una inhibición o bien una activación del enzima. Ante este hecho, se designó de tipo A₂ a los receptores de adenosina que producían la activación de la adenilato ciclasa tras la unión de agonistas y se denominaron de tipo A₁ a los receptores de adenosina que provocaban la inhibición de la adenilato ciclasa como respuesta a la unión de agonistas. (Van Calker et al, 1979). Cabe tener en cuenta sin embargo, que la adenosina no tan sólo puede modificar los niveles de AMPc, sino que puede actuar sobre otros segundos mensajeros. Por este motivo, la actual subclasificación de los receptores de adenosina está basada en las afinidades relativas de una serie de agonistas y antagonistas, en la potencia relativa de los agonistas en la formación de segundos mensajeros y en la información estructural disponible a partir de la clonación de estas proteínas. El perfil de orden de potencia para la unión de los análogos de adenosina R-PIA, S-PIA, CHA, NECA, CADO, CGS-21680 a los distintos subtipos de receptores de adenosina, se muestra en la Tabla 1.

Los receptores A₁ presentan más afinidad por el isómero R de la PIA, mientras que, el subtipo A₂ no presenta esta estereoselectividad (Paton and Kurahashi, 1981). Esta diferencia se ha utilizado con frecuencia para distinguir estos dos subtipos de receptor de adenosina.

La disponibilidad inicial de ligandos específicos para el subtipo A₁ permitió avanzar en su estudio, siendo, por lo tanto, el subtipo de receptor mejor conocido. La activación del receptor A₁ provocaba diferentes tipos de respuestas fisiológicas, por lo que se pensó en la existencia de diferentes subclases dentro del subtipo A₁. Gustaffson et al, 1990 propusieron una subdivisión de los receptores A₁ en base a diferencias en la afinidad por los agonistas y antagonistas característicos de este subtipo proponiéndose la subclasificación de A_{1A} (predominante en SNC y de mayor afinidad por agonistas y antagonistas), y A_{1B} (predominante en tejidos periféricos). Sin embargo, esta clasificación no ha sido aceptada ya que no existe ninguna prueba que descarte el hecho de que se trate de la misma molécula y, además, no se han podido establecer diferencias estructurales entre ellos (Fredholm et al, 1994). Actualmente las diferencias en la afinidad del receptor A₁ por sus

ligandos se atribuyen a su capacidad de interacción con diferentes proteínas G, responsables de las respuestas fisiológicas observadas (Lindén, 1994).

En 1991, se ha visto que los agonistas más característicos más antinociceptivos de estos subtipos de receptores son NECA y Ado (PIA), los cuales

Subtipo	A ₁	A _{2A}	A _{2B}	A ₃
Proteína G acoplada	G _{i(1-3)}	G _i	G _s	??
Efectores acoplados	↓AMP _c ↑IP ₃ ↑ δ ↓ Ca ²⁺ ↑ K ⁺	↑AMP _c	↑AMP _c	↓AMP _c
Agonistas	<u>Alta (0.3-3nM)</u> CPA, CHA, R-PIA <u>Interm (3-30nM)</u> NECA, CADO, Ado <u>Baja (30nM>1μM)</u> S-PIA, CV1808, CGS21680.	<u>Alta (1-20nM)</u> NECA, CGS21680, Ado. <u>Interm (20-200nM)</u> CADO, CV1808, R-PIA <u>Baja (200nM-500nM)</u> CPA, CHA, S-PIA	<u>Alta (0.5-5μM)</u> NECA <u>Interm (5-20μM)</u> 2-CADO, Ado, R-PIA <u>Baja (200nM-500nM)</u> S-PIA, CGS21680,	<u>Alta (<10nM)</u> N6-benzyl-NECA, APNEA <u>Interm.(10-30nM)</u> NECA, R-PIA <u>Baja (100nM>1μM)</u> CGS21680, Ado.
Antagonistas	<u>Alta (0.5-2nM)</u> DPCPX, XAC <u>Intermedia (2-200nm)</u> CPT, 8-PT <u>Baja (1>20μM)</u> 8-pSTP, teofilina	<u>Alta (20-100nM)</u> XAC, KF17837 <u>Intermedia (0.2-2μM)</u> CPT, DPCPX, 8-PT <u>Baja (200nM-500nM)</u> DMPX, teofilina, cafeina	<u>Alta (20-100nM)</u> XAC, DPCPX, 8-PT <u>Intermedia (0.5-10μM)</u> 8-pSPT <u>Baja (200nM-500nM)</u> DMPX, teofilina, cafeina	<u>Alta (1-20nM)</u> BW-A 522

Tabla I. Clasificación, ligandos y sistemas efectores acoplados.

Mediante experimentos de unión del agonista NECA en presencia de CADO, se puso inicialmente de manifiesto la existencia del subtipo A₂. Estudios posteriores de unión de radioligandos a los receptores A₂ y la determinación de la producción de AMPc como segundo mensajero, demostraron la existencia de un centro menos afín de unión a NECA que difería de los subtipos A₁ y A₂. Este

centro, estaba asociado a la estimulación de la actividad adenilato ciclasa y presentaba una distribución tisular y un orden de afinidad por agonistas y antagonistas bien diferenciados del subtipo A_2 clásico (Daly et al, 1983; Londos et al, 1983). El nuevo centro tomó entidad propia, definiéndose como el centro A_{2B} , para diferenciarlo del anteriormente identificado que pasó a denominarse A_{2A} (Bruns et al, 1986). Tras la clonación de ambos subtipos (Libert et al, 1989; Pierce et al, 1992; Rivkees and Reppert, 1992; Stehle et al, 1992), desaparecieron las opiniones favorables a considerar el subtipo A_{2B} como un estado de baja afinidad del receptor A_{2A} .

El receptor A_3 , el cuarto subtipo de receptor de adenosina fue identificado relativamente tarde en la historia de los receptores P1 de adenosina. Zhou et al, 1992 clonaron, expresaron y caracterizaron funcionalmente este nuevo tipo de receptor en estriado de rata. Receptores A_3 homólogos al de rata han sido clonados en pituitaria de oveja (Linden et al, 1993) y en corazón humano (Salvatore et al, 1993). El receptor A_3 de adenosina está acoplado a proteína $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$ y en algunos casos también a $G_{q/11}$ (Palmer et al, 1995). En cerebro de rata el receptor A_3 estimula la PLC elevando los niveles de IP_3 y el Ca^{2+} intracelular (Ali et al, 1990; Ramkumar et al, 1993). También se ha sugerido que inhibe la actividad adenilato ciclasa. (Zhou et al, 1992; Abbracchio et al, 1995). La principal clase de agonistas selectivos para este receptor son las adenosina-5' uronamidas N^6 sustituidas por ejemplo la IB-MECA (N^6 -(3-yodo-benzyl)-5'-(N-methylcarbamoyl) adenosine (van Galen et al, 1994). La selectividad aumenta con sustituciones en la posición 2 como la 2-cloro-IB-MECA altamente selectiva para A_3 versus A_1 o A_{2A} (Kim et al, 1994). Se conocen distintas clases de antagonistas, un primer grupo lo constituyen las xantinas y sus derivados (Zhou et al, 1992; Linden et al, 1993, Ji et al, 1994), y un segundo grupo los flavonoides MRS 1067, MRS 1097 y MRS 1191 y el triazoloquinazoleno MRS1220 (Jacobson et al, 1997). Este receptor presenta una amplia distribución pero su papel fisiológico se desconoce. El mRNA del receptor A_3 se expresa en testículo, intestino, riñón, placenta, corazón, cerebro, bazo, hígado, útero, ojos, de rata y humanos (Zhou et al, 1992; Rivkees et al, 1994; Dixon et al, 1996)

Se ha propuesto un cuarto subtipo de receptor de adenosina, el A_4 , en base a estudios de desplazamiento de unión del agonista de A_{2A} 2-fenilaminoadenosina (CV 1808), en cerebro (neuronas de estriado) (Cornfield et al, 1992) y también se ha propuesto su presencia en aorta (Dubey et al, 1996) pero ante la falta de clonación, no está demasiado claro si se trata realmente de un nuevo subtipo de receptor o podría tratarse del mismo receptor A_{2A} , ya que ensayos de unión de

ligandos en células COS transfectadas con dicho receptor (A_{2A}) presentan un perfil parecido al nuevo subtipo descrito como A_4 , en función de la temperatura del ensayo (Luthin and Linden, 1994, 1995).

1. 2. 2. RECEPTOR A_1 DE ADENOSINA.

1. 2. 2. 1. Caracterización molecular de los receptores A_1 .

La estructura y características moleculares de los receptores A_1 de adenosina han sido estudiadas mediante tres técnicas complementarias: la unión covalente al receptor de ligandos marcados (*crosslinking* y fotoafinidad); la purificación del receptor a homogeneidad, y la clonación, secuenciación y expresión del receptor de varias especies. Se ha fotomarcado el receptor A_1 de diversas procedencias mediante la unión de radioligandos agonistas o antagonistas (Klotz et al, 1985; Barrington et al, 1989; Ciruela et al, 1995). El análisis posterior mediante electroforesis con geles de poliacrilamida del receptor fotomarcado, pone de manifiesto que es una proteína de peso molecular aparente entre 34-39 kDa según la especie estudiada. Así ocurre con el receptor de cerebro de rata (34 kDa, Nakata, 1992), humano (35 kDa, Nakata, 1992), bovino (37 kDa, Olah et al, 1990) o de cerdo (39 kDa, Ciruela et al, 1995). El receptor A_1 de adenosina es una glicoproteína que contiene una única cadena de carbohidratos de tipo complejo (Stiles, 1986; Olah et al, 1990). Las ligeras diferencias de peso molecular entre las diferentes especies, pueden ser precisamente debidas al diferente grado de glicosilación, así el tratamiento con glicosidasas incrementa la movilidad electroforética del receptor hasta un peso molecular correspondiente a 32 kDa.

El receptor A_1 ha sido purificado a homogeneidad mediante columnas de afinidad con ligandos agonistas (Munshi and Linden, 1989) o antagonistas (Olah et al, 1990; Nakata et al, 1992). La purificación del receptor mediante columnas de afinidad con agonistas, da lugar a la copurificación del receptor con diferentes proteínas G ($G_{\alpha 0}$, $G_{\alpha 11}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\beta 35}$, $G_{\beta 36}$) (Munshi and Linden, 1989; Munshi et al, 1991). Por el contrario, en la purificación con columnas de afinidad acopladas a antagonistas, se obtiene el receptor libre de proteína G (Nakata, 1992), lo que confirma que, al contrario que los agonistas, los antagonistas no estabilizan el complejo receptor-proteína G.

La clonación, secuenciación y expresión del receptor A_1 de varias especies como perro (Libert et al, 1991), rata (Mahan et al, 1991), conejo (Hill et al, 1997), buey (Olah et al, 1992), ave (Aguilar et al, 1995) y humano (Libert et al, 1992), han permitido conocer la estructura primaria de esta proteína y los aminoácidos implicados en el reconocimiento del ligando y en los mecanismos de regulación. Los cDNAs de los receptores A_1 clonados, codifican para una proteína de 326 aminoácidos, de peso molecular 36 kDa. La comparación de las secuencias aminoacídicas del receptor de distintas especies, muestra una homología mayor al 90 % en mamíferos (Ren and Stiles, 1994). La secuencia aminoacídica muestra, además, una topología similar al resto de receptores acoplados a proteínas G , con siete dominios transmembrana de 22-25 residuos hidrofóbicos conectados por 3 bucles extracelulares y 3 intracelulares de tamaños distintos, siendo el bucle extracelular comprendido entre el dominio transmembrana (TM) 4 y el TM5 y el bucle citoplasmático entre los dominios TM5 y TM6 los de mayor tamaño (Figura 2).

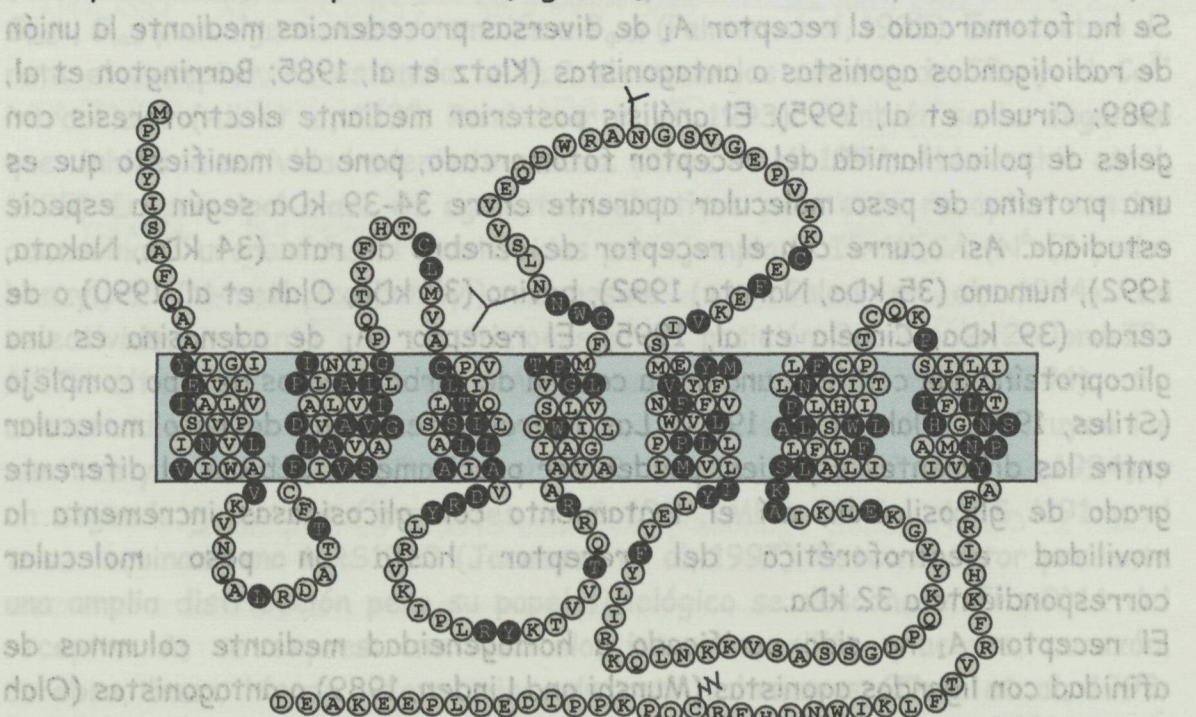


Figura 2. Secuencia aminoacídica y estructura del receptor A_1 de adenosina de rata. En un círculo de color negro se indican los aminoácidos comunes para los cuatro subtipos clonados.

Los receptores de adenosina, presentan características comunes con otros miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G y características inusuales respecto a dichos receptores (Jacobson et al, 1993; Ren and Stiles, 1994).

Como ejemplos de características comunes con otros receptores acoplados a proteínas G se pueden enumerar las siguientes:

1- Presencia de un sitio consenso de palmitoilación. En el dominio C-terminal de los receptores A₁, A_{2B} y A₃ existe una Cys susceptible de ser palmitoilada. Esta característica, también se ha descrito para receptores β-adrenérgicos sugiriéndose que esta palmitoilación podría intervenir en el acoplamiento correcto con la proteína G. (Moffet et al, 1993).

2- Todos los receptores clonados presentan al menos un consenso de N-glicosilación (NXS) en el segundo bucle extracelular y, efectivamente se ha determinado la naturaleza glicoproteica de los receptores A₁ y A_{2A} (Stiles, 1986; Klotz and Lohse, 1986). La función de la glicosilación no está clara pero se ha sugerido un posible papel en la estabilización de la conformación de la proteína, una función protectora frente al ataque de las proteasas o una función de modulación del receptor (Ralevic et al, 1998). Distintas evidencias ponen sin embargo de manifiesto que la presencia de azúcares no influencia la unión de los ligandos (Piersen et al, 1994)

3- Sitios consenso de fosforilación para la PKA y la PKC (Olah et al, 1992). En la secuencia carboxi-terminal del A_{2A}, existen residuos de serina y de treonina que representan dianas potenciales de fosforilación, mientras que los receptores A₁, A_{2B} y A₃ sólo presentan un posible lugar de fosforilación en esta zona pero múltiples consensos en el tercer bucle intracelular (Palmer and Stiles, 1997)

4- Existencia de residuos de Cys en el segundo y tercer bucle extracelular. Los puentes disulfuro que se crean entre estas Cys son importantes para mantener la integridad del sitio de unión del ligando, aunque no formen parte del mismo (Olah et al, 1992). Así se ha detectado sensibilidad de la

la unión de [³H] CGS-21680 a membranas de estriado de rata a agentes reductores de puentes disulfuro como el ditioneitol y el ditionito de sodio lo que sugiere que estos puentes están al menos presentes en el receptor A_{2A}. (Jacobson et al, 1992).

5- Como la mayoría de receptores acoplados a proteína G, el receptor A₁ de adenosina presenta en el segundo bucle intracelular el consenso DYP. Fraser et al, 1988 sugirieron que esta secuencia consenso, podría ser importante para la activación de la proteína G. El tercer bucle del receptor A_{2A} presenta esta secuencia determinante de la selectividad de la proteína G. (Olah et al, 1997)

Dentro de las características más propias de los receptores A₁ de adenosina se pueden enumerar las siguientes

1- El receptor A₁ de adenosina, tiene un peso relativamente bajo (34-39 kDa) comparado con otros receptores acoplados a proteína G (≈ 60 kDa).

2- El tercer dominio intracelular, que se cree implicado en la interacción con la proteína G, es más corto, 34 aminoácidos para los 140-148 de otros receptores.

3- El receptor A₁ posee un único sitio de N-glicosilación (Asn¹⁵⁹) en el segundo bucle extracelular mientras que, lo más general en receptores acoplados a proteína G, es presentarlos también en el extremo amino terminal.

4- Presencia del motivo de unión a caveolina ((ΦXΦXXXΦ); YAFRIHKF Couet et al, 1997) que, aunque todavía no se ha descrito la funcionalidad para este receptor, podría permitir la interacción con un dominio de 41 aminoácidos localizado en la región citosólica proximal de la proteína caveolina (caveolin scaffolding domain).

5- El receptor A₁ de adenosina se fosforila en residuos de Tyr al ser activado por la unión de agonistas (Saura et al, 1998). La fosforilación en Tyr sólo se ha descrito para un pequeño número de receptores de esta familia como el receptor de angiotensina II (Kai et al, 1994)

1. 2. 2. 2. El gen que codifica para el receptor A_1 de adenosina.

El aislamiento y análisis del DNA génomico y del cDNA para el receptor A_1 de adenosina, han proporcionado pistas respecto a cómo tejidos específicos pueden regular el nivel de expresión de dicho receptor y por tanto, sus respuestas a la adenosina (Olah et al, 1994). La figura 3 muestra la estructura del gen humano localizado en el cromosoma 1 y constituido por cuatro exones y tres intrones (Deckert et al, 1995; Ren and Stiles, 1995; Rivkees et al, 1995). El análisis del mRNA de distintos tejidos humanos, ha permitido conocer la existencia de dos transcritos del receptor A_1 : α y β , que tienen su origen en la activación de dos promotores independientes A y B. La transcripción desde el promotor A, implica un *splicing* alternativo que rinde el transcrito α mientras que la activación del promotor B da lugar al transcrito β . Los dos transcritos muestran una expresión diferenciada y tan sólo un número muy restringido de tejidos presenta ambas formas. Todos los tejidos estudiados (cerebelo, corteza cerebral, riñón, testículos, corazón, tejido adiposo y músculo esquelético) expresan el transcrito β , mientras que la expresión del transcrito α es propia de tejidos con una elevada expresión de la proteína, como son cerebro y testículo (Ren and Stiles, 1994a). La presencia en el mRNA β de dos codones stop ATG situados *upstream* respecto al inicio de traducción y que podrían actuar reprimiendo la expresión del receptor A_1 , explicarían la menor expresión traduccional de este transcrito (Ren and Stiles, 1994b).

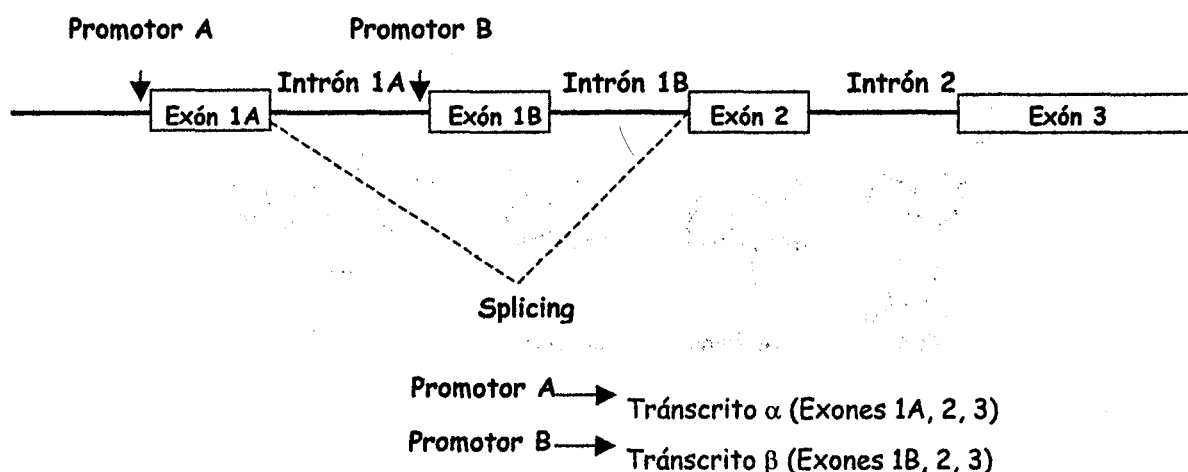


Figura 3. Estructura del gen humano del receptor A_1 de adenosina (Ren and Stiles, 1995)

1. 2. 2. 3. Agonistas y antagonistas del receptor A₁ de adenosina.

Si bien en un principio la propia adenosina fue utilizada en estudios de unión a los receptores de adenosina, (Schawabe et al, 1979) esta molécula no es el mejor ligando debido a su baja afinidad y selectividad, así como por su baja estabilidad ya que puede ser metabolizada por la ecto-adenosina desaminasa o unirse a otros centros de unión como son los transportadores nucleosídicos. Por ello, ha sido necesario el desarrollo de sustancias derivadas de la adenosina, los llamados agonistas y antagonistas, que mantienen las mismas características de unión y funcionalidad (para el caso de los agonistas) del ligando natural, pero presentan mayor estabilidad, afinidad y selectividad que la adenosina. La Figura 4 muestra la estructura de algunos agonistas y antagonistas del receptor A₁ de adenosina.

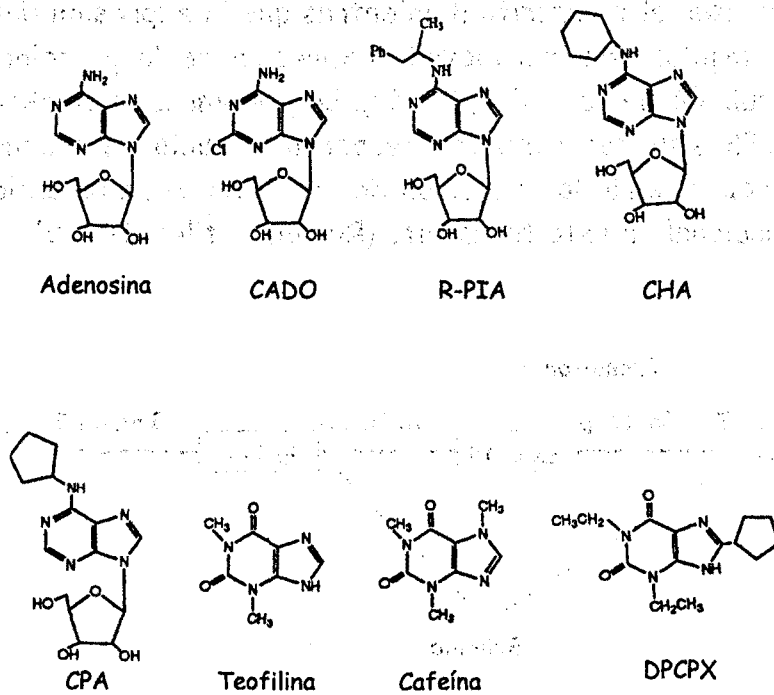


Figura 4. Estructura de los principales agonistas y antagonistas del A₁R.

Se pueden establecer unas características generales para la definición de agonistas (Windscheif, 1996) y antagonistas (Jacobson, 1990) de los receptores de adenosina. En el caso de los agonistas se puede establecer que:

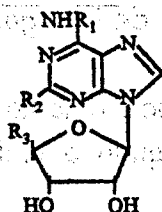
- El N⁶ es esencial, sin este residuo amino no hay actividad.
- La sustitución con un grupo alquilo o arilo en N⁶ confiere generalmente selectividad para A₁.
- La sustitución en C² con un grupo voluminoso, favorece la selectividad por A₂.
- Las sustituciones en C⁸ no son bien toleradas.
- No están permitidas las modificaciones en el anillo de ribosa; sin embargo sí se tolera N-alquilcarboxamida en C-5' un ejemplo lo constituye la NECA.
- La quiralidad del sustituyente en N⁶ es muy importante para el subtipo A₁.

Los derivados de adenosina que están sustituidos en N⁶ tales como el CHA, CPA y R-PIA, el análogo 2-CADO sustituido en C², el análogo NECA sustituido en la posición 5' de la ribosa y el análogo CGS-21680 sustituido en C² y en 5' han constituido elementos de gran valor en la determinación farmacológica y clasificación de los receptores de adenosina. La selectividad de los derivados de adenosina sustituidos en N⁶, C² y en 5' se muestran en la Tabla II.

En el caso de los antagonistas, las xantinas naturales como la cafeína (1,3,7-trimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina) fueron los primeros ligandos estudiados de los receptores de adenosina (Figura 4; Sattin and Rall, 1970). Las xantinas naturales sin embargo, poseen baja selectividad y muy poca afinidad (micromolar) por los receptores de adenosina además de actuar como inhibidores de las fosfodiesterasas (Williams et al, 1989). Por ello, se han sintetizados derivados de xantina en los que se pueden establecer unos criterios estructurales básicos (Tabla III)

- Los derivados alquilo en N¹ o N⁷ favorecen una moderada selectividad frente al subtipo A₂.
- La dialquilación homóloga en N¹ y N³ confiere selectividad para A₁.
- La sustitución en N⁸, incluyendo alquilo, ciclopentilo, ciclohexilo y residuos fenilo, incrementa la afinidad; sin embargo, uno de los mayores problemas de estos compuestos es su escasa solubilidad en agua.

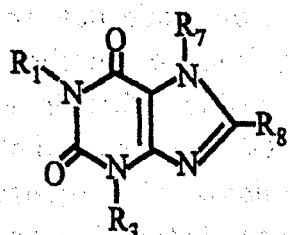
- Las 8-estirilxantinas presentan selectividad frente al subtipo A_{2A}.



Compuesto	R1	R2	R3	Selectividad
Adenosina	H	H	CH ₂ OH	-
CPA		H	CH ₂ OH	A ₁
CHA		H	CH ₂ OH	A ₁
S-ENBA		H	CH ₂ OH	A ₁
D-PTA		H	CH ₂ OH	A ₁
I-AHPIA		N ₃	CH ₂ OH	A ₁
I-ABA		H	CH ₂ OH	A ₁ >A ₃
I-APNEA		H	CH ₂ OH	A ₁ >A ₃
CV1808	H		CH ₂ OH	A _{2A} >A ₁
MPEA	H		CH ₂ OH	A ₁ =A _{2A} >A ₂
CADO	H	Cl	CH ₂ OH	A ₁ =A _{2A}
NECA	H	H	CONH-CH ₂ CH ₃	A ₁
CGS21680	H		CONH-CH ₂ CH ₃	A _{2A}
I-PAPA-APEC	H		CONH-CH ₂ CH ₃	A _{2A}

Tabla II. Agonistas del receptor A₁ de adenosina.

En contraste con los cientos de derivados de xantinas que han sido sintetizados y estudiados como antagonistas de los receptores A_1 y A_2 ; en los últimos años se han identificado como antagonistas un número muy pequeño de compuestos no derivados de xantinas. Entre éstos, destacan una serie de compuestos heterocíclicos como las triazoquinazolinas y los derivados de adenina (Van Galen et al, 1992); el más utilizado es el CGS-15943, antagonista relativamente selectivo del subtipo A_{2A} .





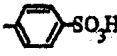
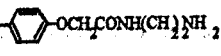


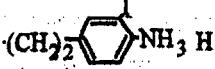
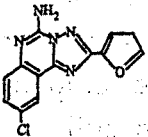
Compuesto	R	R	R	R	Selectividad
Teofilina	CH ₃	CH ₃	H	H	-
IBMX	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃)	H	H	-
Cafeína	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	-
CHC	CH ₃	CH ₃	CH ₃		A_{2A}
8-PT	CH ₃	CH ₃	H		A_1
8-SPT	CH ₃	CH ₃	H		-
XAC	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H		A_1
DPCPX	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H		$A_1 > A_2$
KW-3902	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	H		A_1
I-BW-A448U	CH ₂ CH ₃		H	H	A_1
CGS 15943					A_{2A}

Tabla III. Antagonistas del receptor A_1 de adenosina.

1. 2. 2. 4. Distribución tisular y efectos fisiológicos de la adenosina mediados por el receptor A₁.

La distribución y abundancia relativa del receptor A₁ de adenosina en los diferentes tejidos se analizó inicialmente mediante técnicas de unión de radioligandos (agonistas y antagonistas) (Bruns et al, 1987) y técnicas de fotomarcaje y autoradiografía (Klotz et al, 1985). La clonación del receptor, ha permitido generar anticuerpos específicos contra el receptor y sondas para el reconocimiento de su RNA, de modo que en los últimos años se ha podido determinar por inmunocitoquímica o Northern Blot la cantidad relativa del receptor en los diferentes tejidos (Ciruela et al, 1995; Stehle et al, 1992; Dixon et al, 1996). La Tabla IV muestra la distribución tisular del receptor A₁ de adenosina analizada mediante el conjunto de técnicas mencionadas. El receptor A₁ está ampliamente distribuido en el organismo, aunque es en el sistema nervioso central donde se expresa en mayor abundancia. Mediante la unión de radioligandos (Bruns et al, 1986) y ensayos de Northern Blot e hibridación *in situ*, (Mahan et al, 1991; Stehle et al, 1992; Meng et al, 1994; Dixon et al, 1996) se han podido establecer las zonas del cerebro con mayor expresión de A₁, siendo éstas la corteza, el hipocampo, el cerebelo, el tálamo y el estriado. La expresión del receptor, parece más evidente en neuronas que en células gliales (Mahan et al, 1991). En las neuronas se detecta tanto a nivel pre como postsináptico. (Abbracchio et al, 1995).

A través del receptor A₁, la adenosina puede ejercer muchos y variados efectos fisiológicos, la mayor parte de ellos relacionados con la regulación del aporte y consumo local de oxígeno (Tabla IV). Así, ante una demanda energética mayor que el aporte energético, como corresponde a los estados de hipoxia, la producción de adenosina aumenta mayoritariamente por metabolismo intracelular del ATP. Esta adenosina se exporta al medio extracelular donde reduce el consumo de oxígeno al mismo tiempo que aumenta el aporte energético (Miller and Hsu, 1992). La disminución de la actividad locomotora, la inhibición de la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina (Cunha et al, 1994; Broad and Fredholm, 1996), dopamina (Jin et al, 1993; Ballarin et al, 1995), y noradrenalina (Abbracchio et al, 1995) y la disminución del ritmo cardíaco, son efectos que la adenosina ejerce vía sus receptores con el objetivo de reducir la demanda de oxígeno (Belardinelli, 1993; Zhu and Krnjevic, 1997). Por otro lado, la vasodilatación producida por la adenosina mediada por el receptor A₂ en el cerebro, en el corazón y en otros tejidos, excepto el riñón, conjuntamente con los efectos producidos a través del

receptor A_1 , tienden a incrementar el flujo sanguíneo y mejorar el suministro de oxígeno (Fredholm and Sollevi, 1986):

TEJIDO	EFEECTO FISIOLÓGICO	RECEPTOR
Sistema nervioso central	Inhibición liberación neurotransmisores	A_1 A_{2A}
	Inhibición actividad locomotora Sedación	A_1 A_1
Sistema cardiovascular	Vasoconstricción	A_1
	Vasodilatación	A_{2A}
	Inhibición ritmo cardíaco	A_1, A_3
	Inhibición agregación	A_{2A}
Aparato respiratorio	Broncodilatación	A_{2A}
	Broncoconstricción	A_1
	Modulación secreción	??
Riñón	Antidiurético	A_1
	Descenso flujo filtración glomerular	A_1 A_1/A_2
	Modulación liberación renina	A_1/A_3
Sistema Inmunológico	Inhibición quimiotaxis (neutrófilos)	A_1 A_{2A}
	Inhibición producción superóxidos	A_{2B}
Hígado	Estimulación captación glucosa	?? A_{2A}
Tejido adiposo	Inhibición lipólisis	A_1
Aparato reproductor	Testículos	A_1/A_3
	Vaso deferente	A_1/A_{2A}
	(contracción musculatura lisa)	

Tabla IV. Efecto de la adenosina vía sus receptores de membrana

En el riñón, la adenosina reduce la velocidad de filtración glomerular por vasoconstricción de las arteriolas aferentes vía el receptor A_1 y vasodilatación de las arteriolas eferentes vía el receptor A_2 (Biaggioni, 1992). También en el riñón la adenosina inhibe (A_1) o estimula (A_2) la liberación de renina y la producción de eritropoyetina (Spielman and Arend, 1991; Protasoni et al, 1996)

1. 2. 2. 5. Transducción de la señal a través del receptor A_1 de adenosina.

Los receptores acoplados a proteína G , como todo el conjunto de receptores, mantienen a la célula en un estado permanentemente sensible a cambios en su entorno y deben ser capaces de transmitir señales a la célula que permitan dar respuesta a estos cambios. La respuesta intracelular a estos receptores está mediada por su interacción con proteínas G heterotriméricas, las cuales activan o inhiben los llamados sistemas efectores (enzimas y canales iónicos). Estos sistemas efectores regulan la concentración de un conjunto de segundos mensajeros, AMPc, IP_3 , diacilglicerol, Ca^{++} , que son los que, en última instancia, desarrollan la respuesta celular.

Las proteínas G a las que se asocian los receptores de la familia de siete dominios transmembrana son proteínas heterotriméricas pertenecientes a la gran superfamilia de proteínas que unen GTP, poseen actividad GTPasa intrínseca (Neer, 1995) y están formadas por tres subunidades distintas: α , β , y γ . Las subunidades β y γ existen como un complejo asociado que funciona como una unidad. Aunque el mismo complejo $\beta\gamma$ puede aparentemente unirse a distintas subunidades α para formar heterotrimeros, la identidad de la subunidad α se utiliza normalmente para definir el tipo de proteína G

La subunidad α de 39-46 kDa se clasifica en cuatro familias (α_s , α_i , α_q , $\alpha_{12/13}$) en función de su estructura primaria con más de veinte miembros cada una de ellas. Esta subunidad es la que presenta un único sitio de unión y de elevada afinidad para los nucleótidos de guanina (GDP, GTP). La forma unida al GDP está fuertemente asociada al complejo $\beta\gamma$, mientras que la forma unida a GTP se disocia del complejo y funciona como un regulador de proteínas efectoras. El tetrafluor de aluminio (AlF_4^-) así como el Mg^{2+} pueden interaccionar con la subunidad α unida al GDP y mimetizar el efecto del GTP activando la subunidad. Todas las subunidades α tienen actividad enzimática GTPasa catalizando la hidrólisis del fosfato terminal del GTP, liberando GDP y fosfato inorgánico (Pi).

Aparte del dominio con actividad GTPasa también presentan un dominio α -helicoidal y una región variable amino terminal (Lambright, 1996) que es esencial para su unión al complejo $\beta\gamma$ mientras que el dominio C-terminal parece definir la especificidad de la interacción de la proteína con el receptor, aunque no es el único dominio determinante (Conklin et al, 1993) En algunos casos las subunidades α tienen residuos que pueden ser modificados covalentemente por toxinas bacterianas.

Se han identificado hasta cinco tipos distintos de subunidad β (37kDa). Esta subunidad presenta en su región amino terminal una hélice α anfipática que permitirá su interacción en una estructura de *coiled-coil* con la región amino terminal de la subunidad γ . La subunidad γ (8 kDa) la menos conservada de todas ellas (Cali et al, 1992), está formada por dos hélices α y una región intermedia que interacciona y determina la selectividad por las distintas subunidades β (Lupas et al, 1992; Spring and Neer, 1994; Lambright et al, 1996). La subunidad $\beta\gamma$ forma una estructura glomerular cuyas subunidades interaccionan fuertemente y sólo pueden separarse por agentes desnaturalizantes. La subunidad $\beta\gamma$ tiene numerosas funciones, estabilizar la forma GDP- α facilitando su asociación con los receptores para formar el complejo ternario receptor- $\alpha\beta\gamma$ (Clapham and Neer, 1993), facilitar la formación del complejo receptor-proteína quinasa que posibilita la fosforilación del receptor (Lefkowitz, 1993; Pitcher et al, 1992) y activar directamente numerosos sistemas efectores (Clapham and Neer, 1993). Aunque ninguna de las subunidades de las proteínas G presenta regiones que puedan interaccionar con la bicapa lipídica, estas proteínas están unidas a la membrana plasmática. Ello se debe a que la subunidad γ está prenilada y algunas subunidades α miristiladas. Estas modificaciones lipídicas permiten el anclaje de las subunidades a la membrana (Hepler et al, 1992)

El mecanismo de señalización común a la familia de receptores acoplados a proteínas G, (Figura 5; Birnbaumer, 1990; Bourne et al, 1991; Conklin and Bourne, 1993; Neer, 1995) se inicia con la unión del agonista a su receptor específico de membrana. Ello provoca un cambio conformacional en el receptor y permite su interacción con el heterotrímero inactivo GDP- $\alpha\beta\gamma$. A su vez esta interacción, conduce a una pérdida de afinidad de la subunidad α por el GDP, liberándose éste. Como la concentración de GTP en la célula es muy superior a la de GDP, el grupo GDP saliente se ve reemplazado por GTP, activándose la subunidad α y disociándose de $\beta\gamma$. El estado activo, se mantiene hasta que la actividad intrínseca GTPásica de la subunidad α hidroliza el GTP a GDP, y mientras las subunidades de la proteína G están disociadas, se permite la

activación de los efectores diana, tanto por α -GTP como por $\beta\gamma$. En la tabla V aparecen algunos de los sistemas efectores activados por las subunidades de las proteínas G (Tabla V) (Neer et al, 1995)

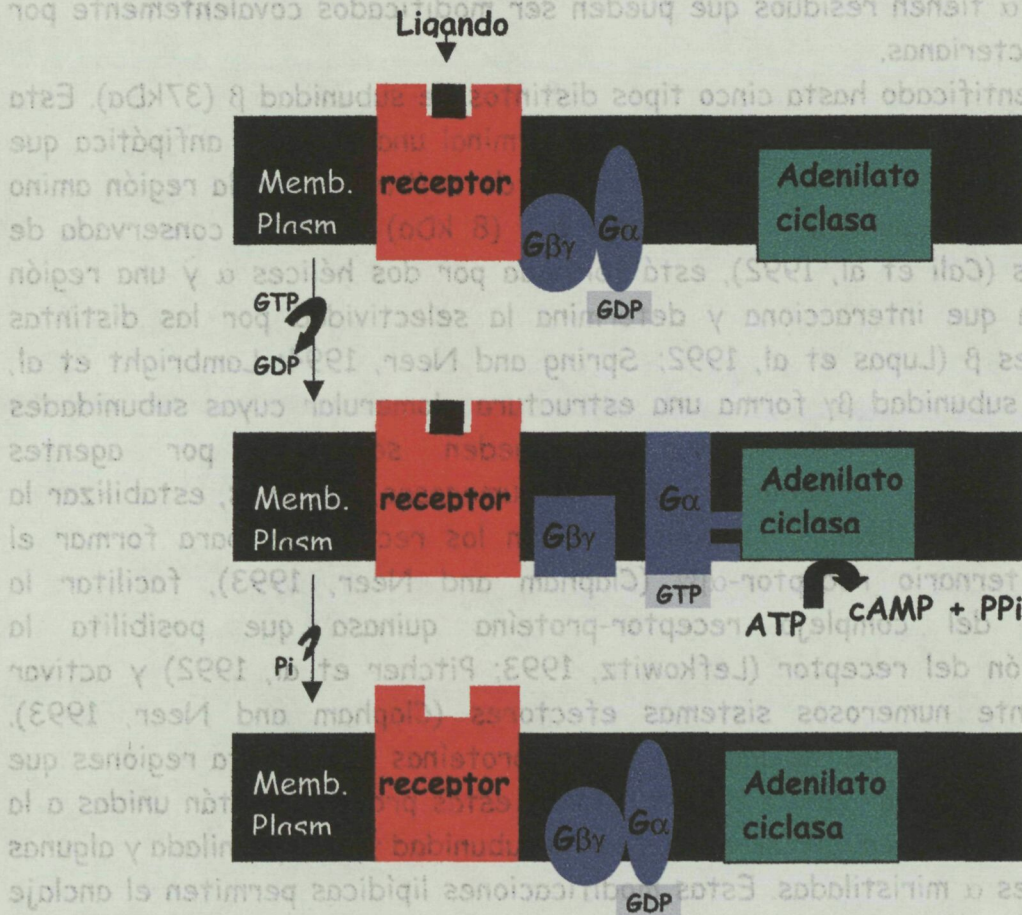


Figura 5. Mecanismo de señalización de los receptores acoplados a proteína G

Existen diferentes estrategias que permiten abordar el estudio de la señalización a través de receptores acoplados a proteínas G. Una estrategia muy común es analizar la sensibilidad que la unión ligando-receptor o la producción de segundos mensajeros presenta a toxinas bacterianas. Así, la toxina colérica (CTX) activa constitutivamente a la proteína G, ya que provoca

la transferencia de ADP-ribosa a una Arg específica presente en las subunidades α_s , induciendo la inhibición en la actividad GTPásica de dicha subunidad (Yamane and Fung, 1993). La toxina pertusis (PTX) también cataliza la ADP-ribosilación pero en un residuo de Cys próximo al extremo carboxi terminal de las subunidades α_i y α_o . Esta modificación, impide la activación de la proteína G mediada por el receptor, por lo que desacopla irreversiblemente el receptor del sistema efector (Hepler and Gilman, 1992).

FAMILIA SUBFAMILIA EFECTORES MENSAJERO INTRACELULAR

G_{α_s}	α_s	↑ Adenilato	↑ AMPc
		↑ Canales de Ca^{2+}	↑ Ca^{2+}
	α_{olf}	↑ Adenilato	↑ AMPc
G_{α_i}	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$	↓ Adenilato	↓ AMPc
		↑ Canales de K^+	↑ K^+
	α_o	↓ Canales de Ca^{2+}	↓ Ca^{2+}
	α_z	↓ Adenilato	↓ AMPc
	α_{t1}	↑ GMPc fosfodiesterasa	↓ GMPc
	α_{t2}	↑ GMPc fosfodiesterasa	↓ GMPc
	α_{aust}	??	
G_{α_o}	$\alpha_o, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}$	↑ Fosfolipasa C (β)	↑ IP ₃ , DAG
$G_{12/13}$	α_{12}, α_{13}	↑ ↓ Intercambio Na^+/K^+	
$G_{\beta\gamma}$	$\beta\gamma$	↓ Adenilato ciclasa	↓ AMPc
		↑ Adenilato ciclasa (II)	↑ AMPc
		↑ Canales de K^+	↑ K^+
		↑ Fosfolipasa	↑ Ac. Araquid.
		↑ Fosfolipasa	↑ IP ₃ , DAG

Tabla V. Clasificación y función de las subunidades de la proteína G

Una célula, sólo puede responder a señales para las que posea receptor que las active, pero la especificidad con la que el receptor interacciona con la proteína G define la respuesta celular. Aunque un solo receptor puede activar potencialmente múltiples señales, el número de señales es relativamente bajo (Neer, 1995). La selectividad puede residir en que se produzca o no, en un determinado dominio de la membrana plasmática, el acoplamiento receptor/proteína G y el acoplamiento proteína G /efector. Existen evidencias que la distribución y movilidad de las proteínas G y de los receptores, pueden estar restringidas a ciertos microdominios de la membrana como pueden ser la caveolas. Así Li et al, 1995, mediante ensayos de unión *in vitro*, pusieron de manifiesto la existencia de interacciones entre diferentes subunidades α (α_s , α_o , α_i) y la caveolina, la principal proteína de las caveolas, sugiriendo que la caveolina, podría funcionar como un regulador negativo del estado de activación de las proteínas G. Por otro lado, estudios realizados por de Weerd et al 1997, muestran que, tras la ocupación del receptor B2 de bradiquina por su ligando, el complejo receptor/ligando/subunidad α es reclutado y secuestrado en las caveolas.

El receptor A_1 de adenosina media una gran variedad de respuestas intracelulares vía su acoplamiento a diferentes subunidades G pertenecientes a la subfamilia G_i y/o G_o (Freissmuth et al, 1991; Munshi et al, 1991). Ambas subunidades son sustrato de la toxina pertusis que las ADP-ribosila desacoplándolas del receptor. De acuerdo con este hecho, los efectos del receptor A_1 se bloquean por toxina pertusis. Sin embargo, los receptores A_1 presinápticos parecen ser al menos en parte resistentes a dicha toxina (Fredholm et al, 1989, Hasuo et al, 1992). Una posible explicación sería la existencia de una unión extremadamente fuerte entre el receptor y la proteína G que fuera resistente al desacoplamiento ante la presencia de la toxina (Van der Ploeg et al, 1992). Una proteína parcialmente purificada con selectividad para la subunidad α de la proteína G se ha demostrado que estabiliza el complejo receptor A_1 /proteína G en cerebro de rata (Nanoff et al, 1997).

La señal más ampliamente reconocida y estudiada del receptor A_1 es la inhibición de la adenilato ciclasa provocando una disminución en los niveles del segundo mensajero AMPc (van Calker et al, 1979, Londos et al, 1980). Este a su vez modula la actividad de las protein quinasas dependientes de AMPc las cuales fosforilan diversas proteínas diana. El receptor A_1 acoplado a adenilato ciclasa se ha descrito en una gran variedad de tejidos incluyendo el cerebro, tejido adiposo y testículos.

Otro sistema efector acoplado al receptor A_1 es la activación de la fosfolipasa C (PLC) implicada en el metabolismo de los fosfoinosítoles de membrana incrementando la producción de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), diacilglicerol (DGA) y movilizando Ca^{2+} . Este sistema efector se ha caracterizado en células de ovario de hamster (CHO)-K1 transfectadas con el receptor A_1 humano (Iredale et al, 1994; Megson et al, 1995) así como en tejidos que expresan endógenamente el receptor, en la línea celular de musculatura lisa de hamster DDT₁-MF2 (Gerwins and Fredholm 1992; White et al, 1992), en corazón (Scholz et al, 1993), en células renales (Weinberg et al, 1989) en las que el receptor A_1 media la vasoconstricción y la disminución de la filtración glomerular, en cultivos de células mesangiales (Olivera et al, 1992a, b), y en astrocitos (Peakman and Hill, 1995). El IP_3 estimula la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares mediante la interacción con receptores específicos localizados en el retículo sarcoplasmático. La elevación del Ca^{2+} citosólico por IP_3 puede estimular todo otro conjunto de señales como son la vía de la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa A_2 (PLA_2), la óxido nítrico sintasa (NOS), canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} . Las neuronas expresan gran cantidad de canales de K^+ acoplados al receptor A_1 que pueden regular el potencial de membrana y determinar la frecuencia y duración del potencial de acción. Los receptores A_1 disminuyen la excitabilidad neuronal mediante la hiperpolarización generada por un aumento en la conductancia al K^+ (Pan et al, 1995). Los receptores A_1 también están acoplados a la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} , las cuales pueden tener un papel en la inhibición de la liberación de neurotransmisores (Fredholm et al, 1995), aunque otros mecanismos también están implicados en este proceso.

La liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas depende de un aumento en el Ca^{2+} intracelular que estimula la liberación de neurotransmisores desde las terminales presinápticas. Este aumento de Ca^{2+} puede ser producido por la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares o por la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular.

1. 2. 3. MECANISMOS DE ENDOCITOSIS. El receptor A_1 puede ser internalizado por endocitosis.

El receptor A_1 puede ser internalizado por endocitosis.

2. 2. 3. 1. Secuestro y Down-regulation de receptores acoplados a la proteína G. Vesículas de endocitosis.

El receptor A_1 puede ser internalizado por endocitosis.

La respuesta celular que acontece tras la activación de un receptor está modulada por una multitud de factores que actúan a niveles distintos. Uno de los principales mecanismos de regulación tiene lugar a nivel del propio receptor. Los receptores, tras una exposición crónica al agonista son endocitados y

conducidos a los compartimentos endosomales desde los que pueden ser reciclados a la superficie celular (secuestro y resensibilización) o dirigidos a los lisosomas para su degradación (*down-regulation*).

La endocitosis inducida por agonistas es una característica común a los receptores acoplados a proteínas G (Clark, R. B; 1986; Riezman et al, 1997; Di Fiore et al, 1999;), siendo los receptores β -adrenérgicos los mejor estudiados. En estos receptores, la desensibilización está mediada por 2 mecanismos: la fosforilación, en la que participan las protein quinasas PKA y β -ARK que provocan un desacoplamiento funcional de la proteína G (Barak, et al, 1997; Roth et al, 1991; Sibley et al, 1996, Lohse et al 1993) y cambios en la densidad de receptores funcionales en la membrana plasmática (Hausdorff et al, 1988; von Zastrow et al, 1992). La densidad de receptores en la membrana por acción de una exposición crónica al agonista, está mediada por una serie de fenómenos que configuran el secuestro o internalización y la *down-regulation* (Liggett 1999; Piguet et al, 1999; Shockley et al, 1997; Lameh 1996). Mientras la *down-regulation* implica una pérdida neta de receptores en la célula, un proceso que suele ser lento y ocurre gradualmente en un lapso de tiempo que comprende desde los 30 min a las 24 h, el secuestro, por el contrario, es un proceso mucho más rápido en el que se produce una pérdida de sitios de unión de ligandos hidrofílicos en la membrana sin que se aprecie un cambio neto en el número total de receptores en la célula.

Si bien los mecanismos por los que discurren ambos fenómenos no se conocen en su totalidad, se acepta que la *down-regulation* implica degradación del receptor a nivel lisosomal así como una reducción en su biosíntesis, bien por una disminución de los niveles de mRNA o por una disminución de la proteína del receptor y /o la proteína G asociada mientras que el secuestro, sería el resultado de una rápida translocación del receptor desde la membrana plasmática hasta reservorios intracelulares, en los cuales el receptor no se degradaría (Hadcock and Malbon, 1993; Wang et al, 1997).

En términos generales, el secuestro se diferencia por tanto de la *down-regulation* en que mientras ésta conduce a una pérdida irreversible del receptor hasta nueva síntesis proteica, los receptores secuestrados pueden ser devueltos a la superficie celular y volver a ser funcionales, lo que se llama resensibilización (Yu et al, 1993; Pipping et al, 1995).

En el estudio de los procesos de internalización tradicionalmente se han utilizado radioligandos polares, como el ^3H -NMS para los receptores muscarínicos, radioligandos que no pueden atravesar la membrana plasmática y sólo pueden unirse a los receptores libres de la superficie celular. Una

disminución en la unión de estos marcadores, se ha considerado que implica *secuestro* y/o *down-regulation*. Sin embargo no es una técnica idónea ya que no permite descartar que la activación crónica al agonista no produzca simplemente la pérdida de afinidad por el ligando sin que la translocación de receptores hacia el interior celular esté implicada. El uso de técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas conjuntamente con el análisis por citometría de flujo y por microscopía confocal y electrónica, permiten determinar si se trata de una "verdadera" internalización ya que estas técnicas se basan en el marcaje directo del receptor con un anticuerpo y por lo tanto se puede determinar si su densidad como proteína de la membrana varía por exposición a agonistas y si los receptores marcados con el anticuerpo aparecen en el medio intracelular.

Los mecanismos moleculares y los dominios del receptor implicados en el *secuestro* y *down-regulation* no se conocen con exactitud, incluso la necesidad de una internalización para hacer efectiva la *down-regulation* es un punto controvertido. Experimentos de mutagénesis dirigida, sugieren que los determinantes estructurales del receptor que gobiernan el *secuestro* son distintos de los que están implicados en la *down-regulation* ya que mutaciones diferentes a nivel del receptor inhiben un fenómeno pero no el otro. Así en los receptores β -adrenérgicos la *down-regulation* está mediada por fosforilaciones del receptor vía protein quinasa y disminuye ante mutaciones que impliquen interacciones entre el receptor y la proteína G (Bouvier et al, 1987; Campbell et al, 1991). Sin embargo, el *secuestro* del receptor no se inhibe por mutaciones en sitios diana de fosforilación y se mantiene aún en mutantes en los que se impide la interacción con la proteína G (Campbell et al, 1991; Strader et al 1987). Contrariamente, ciertas mutaciones en el extremo C-tal del receptor afectan sensiblemente al *secuestro* sin alterar el acoplamiento a la proteína G o a la *down-regulation* (Hausdorff et al, 1991).

Todavía es más desconocida la vía endocítica por la que tiene lugar la internalización de los receptores acoplados a proteínas G. La microscopía electrónica, utilizando como marcador una peroxidasa, ha revelado la complejidad del sistema endosomal (McCoy et al, 1990; Robinson et al, 1988; Schmid et al, 1993; Seaman et al, 1996; Simonsen et al, 1998). Este es un sistema heterogéneo de membranas, elementos tubulares y vesículas que se extienden desde la periferia celular a la región perinuclear muy cerca del aparato de Golgi aunque perfectamente diferenciable de éste. De un modo muy general, se pueden distinguir principalmente dos clases de endosomas: Endosomas tempranos (*early endosomes*) los cuales se distribuyen justo por

debajo de la membrana plasmática y en ellos se encuentran las moléculas tras 1 min iniciada la internalización y los endosomas tardíos (*late endosomes*) muy próximos al aparato de Golgi y entorno al núcleo en los que se detectan las moléculas tras 5-15 min de internalización (Figura 6). El interior de los compartimentos endosomales es ácido \approx pH 6.0. Este pH, se mantiene gracias a la bomba ATP/H^+ que bombea protones hacia el interior vesicular (lumen) desde el citosol. En general, los endosomas tempranos son menos ácidos que los tardíos.

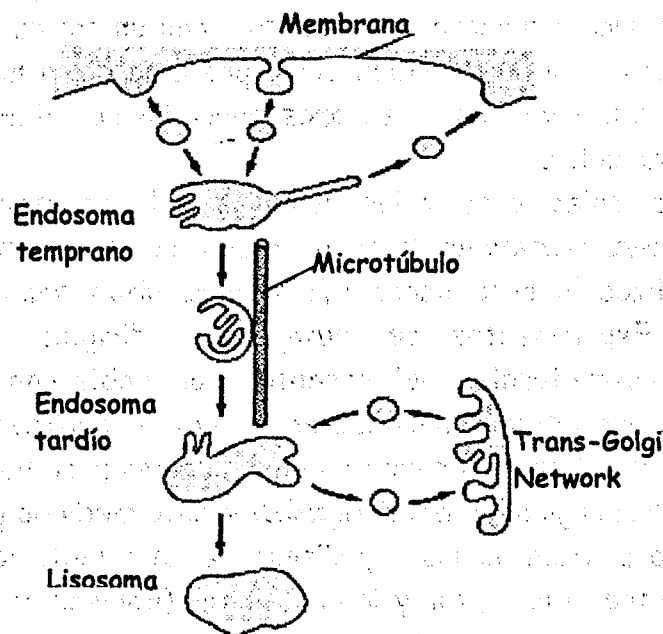


Figura 6. Ruta endocítica desde la m.plasmática hasta los lisosomas

El grado de acidez de estos compartimentos juega un papel clave en el proceso de endocitosis (Bomsel et al, 1991; Hanssem et al. 1993; Mayor et al, 1993; Sorkin et al, 1993). Los endosomas tempranos, actúan como principal punto de distribución de las moléculas endocitadas. El ambiente ácido de este compartimento provoca que los receptores internalizados cambien su conformación liberando sus ligandos, la mayor parte de los cuales son conducidos a los lisosomas para su eliminación. El destino de los receptores es diverso, unos pueden ser reciclados a la membrana plasmática, otros progresan hasta los lisosomas donde son degradados y finalmente en algunos casos, son

conducidos a un dominio distinto de la membrana plasmática en un proceso llamado transcitosis (Rodman et al, 1990) (Figura 7).

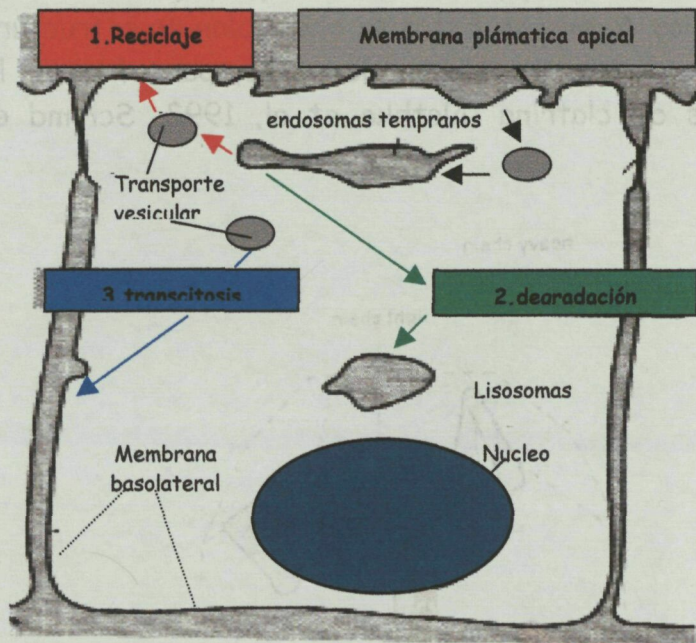


Figura 7. Posibles destinos de los receptores transmembrana tras ser endocitados

La internalización de los receptores acoplados a proteínas G, ocurre vía un complejo proceso endocítico que implica, en los pasos iniciales, el transporte del receptor y su ligando a orgánulos intracelulares. Para un gran número de receptores de esta familia este proceso, está mediado por la formación de vesículas revestidas a partir de zonas especializadas de la membrana (*coated regions*), cuya formación en algunos casos, requiere el ensamblaje en la cara citosólica de la membrana de una proteína de revestimiento (*coat*) (Bottomley et al, 1999; Marsh et al, 1999; McMahon 1999; Schimd et al, 1995).

El primer tipo de vesículas de endocitosis en ser identificadas morfológicamente y en ser definidas bioquímicamente, fueron las vesículas de clatrina, cuya principal proteína de revestimiento es la clatrina (Anderson et al, 1992; ~ 35kDa). Esta proteína está constituida por tres cadenas polipeptídicas largas (cadena pesada; 190 kDa) y tres cadenas polipeptídicas cortas (cadenas ligeras) que forman los *triskelion*. Estos se ensamblan en estructuras convexas de pentágonos y hexágonos en forma de cesto, para formar las llamadas vesículas revestidas de clatrina (Nathke et al, 1992, Schimd et al, 1995) (Figura 8).

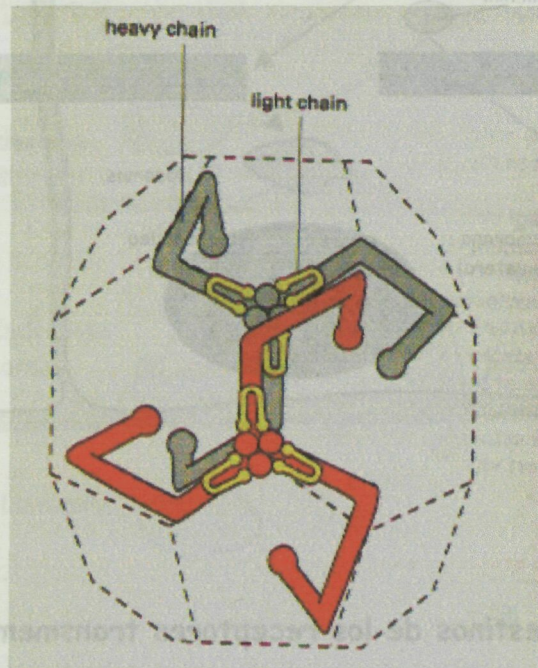


Figura 8. Estructura de la clatrina. Ensamblaje del *triskelion*

La clatrina presenta una doble función, suministrar durante su propio ensamblaje en la cara citosólica de la membrana plasmática la fuerza mecánica necesaria para la formación de las invaginaciones, y actuar como vehículo de captura de receptores específicos de membrana y sus ligandos. Todo ello es posible gracias a la participación de un segundo complejo proteico constituido por múltiples subunidades, las *adaptinas*, siendo las más conocidas AP-1 y AP-2, que promueven por un lado el ensamblaje de clatrina a la membrana

plasmática y por otro lado, actúan como puente uniendo los receptores de la membrana plasmática, destinados a ser endocitados, con algún componente de las vesículas de clatrina (Chang et al, 1993; Sosa et al, 1993) (Figura 9).

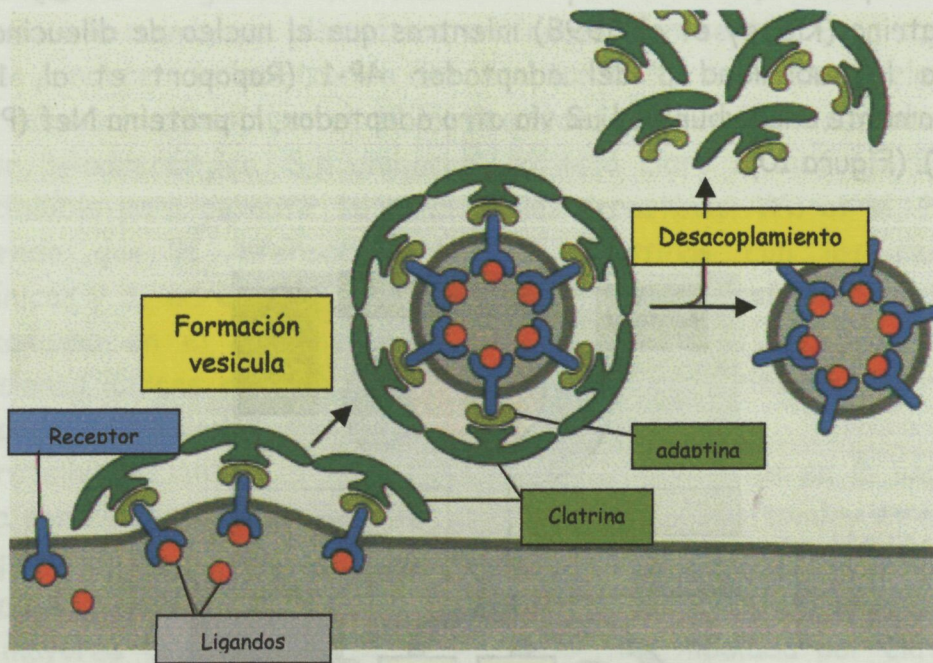


Figura 9. Transporte selectivo mediado por vesículas revestidas de clatrina. Las adaptinas se unen tanto a la clatrina como a los receptores que serán endocitados siendo las responsables de la especificidad de la internalización

Los complejos AP distinguen estructuralmente las vesículas recubiertas de clatrina que se generan a partir de la membrana plasmática de aquellas que se generan a partir del trans-Golgi Network (TGN). Las vesículas originadas desde la membrana plasmática, contienen el adaptador AP-2 constituido por subunidades de 100 kDa denominadas α y $\beta 2$ adaptinas y dos subunidades pequeñas, $\mu 2$ y $\sigma 2$. Las vesículas asociadas al TGN contienen el adaptador AP-1 constituido por γ y $\beta 1$ adaptinas y las subunidades pequeñas $\mu 1$ y $\sigma 1$ (Schimd et al, 1995). La endocitosis requiere además una serie de secuencias lineales en las proteínas objeto de la internalización como son, YXX Φ (donde Φ representa un aminoácido aromático), NPXY o un núcleo de dos leucinas que serán reconocidos por los complejos adaptadores. El motivo YXX Φ es reconocido por

la subunidad $\mu 2$ del adaptador AP-2 (Ohno et al, 1995). Owen y Evans, 1998, han resuelto la estructura cristalina de la subunidad $\mu 2$ de este complejo AP-2 con dos péptidos que presentan este motivo. Los mecanismos de reconocimiento de los motivos NPXY y del núcleo de dos leucinas no está claro. Parece ser que el motivo NPXY puede unirse directamente a la cadena pesada de la clatrina (Kibbey et al, 1998) mientras que el núcleo de dileucina podría unirse a la subunidad β del adaptador AP-1 (Rapoport et al, 1998) o indirectamente a la subunidad $\mu 2$ vía otro adaptador, la proteína Nef (Piguet et al, 1998). (Figura 10)

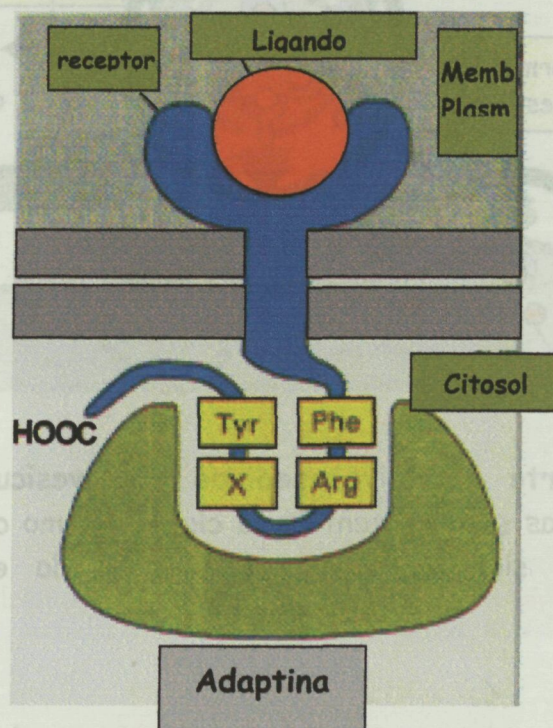


Figura 10. Péptido señal YXXΦ (Tyr, X, X, Phe) reconocido por el complejo AP-2 . El reconocimiento por la adaptina permitirá la internalización del receptor vía vesículas de clatrina.

Goodman et al, 1996, demostraron que la proteína β -arrestina podía actuar como otro adaptador de la clatrina en la endocitosis de los receptores β -adrenérgicos. La familia de las arrestinas está constituida por la arrestina visual, la β -arrestina y la arrestina 3 (Wu et al, 1997). La afinidad de las arrestinas por receptores acoplados a proteína G se ve incrementada por la

fosforilación del receptor y/o activación por agonistas. La β -arrestina y la arrestina-3 promueven la internalización de ciertos receptores de esta familia uniéndose con elevada afinidad y estequiométricamente tanto al receptor como a la clatrina. En respuesta a la activación por agonistas y a la fosforilación del receptor β_2 -adrenérgico, la β -arrestina es reclutada rápidamente desde el citoplasma a la membrana plasmática, uniéndose al receptor. Esto supone una señal que conduce a la localización del receptor en las vesículas de clatrina y a su internalización (Santini et al, 1996) resultando una endocitosis selectiva del receptor β_2 -adrenérgico. Sin embargo, no está claro si la fosforilación es imprescindible para permitir la unión de las arrestinas. Wu et al, 1997 han demostrado que la interacción de las arrestinas con los receptores muscarínicos y α_2 -adrenérgicos ocurre en ausencia de fosforilación. Sugieren un mecanismo en el que las arrestinas se unirían al receptor mediante interacciones iónicas en ausencia de activación y fosforilación del receptor, aumentando la afinidad cuando éstas tuvieran lugar.

Otra proteína recientemente caracterizada es importante en la endocitosis mediada por clatrina, la dinamina (Zhang et al, 1996; Bottomley et al, 1999). Es una proteína de 100kDa con actividad GTPasa originariamente aislada como proteína de unión a microtúbulos dependiente de nucleótidos y constituye uno de los mayores componentes de la vía endocítica mediada por clatrina. La dinamina colocaliza con clatrina y se une a la α -adaptina (Damke et al, 1994, Shpetner et al, 1996) Funcionalmente la dinamina participa en los primeros pasos de la endocitosis, durante la invaginación de la membrana para la ulterior formación de las vesículas de clatrina, un proceso GTP dependiente (Takel et al, 1995; Hinshaw et al, 1995)

Una vez internalizados, los receptores se defosforilan en los endosomas por la acción de fosfatasas. El medio ácido del endosoma, permite que se libere el ligando unido y la arrestina de forma que el receptor puede ser llevado de nuevo a membrana donde podrá ser nuevamente funcional o conducido a lisosomas para su degradación (Krueger et al, 1995; Gouland et al, 1996). La liberación de la clatrina y los adaptadores AP requiere una reacción dependiente de ATP mediada por factores citosólicos no relacionados con la proteína de recubrimiento (*coat*). Una de estas proteínas es la ATPasa/hsc70, que permite el desacoplamiento de la clatrina gracias a la hidrólisis de tres moléculas de ATP (Schmid et al, 1995). La clatrina es liberada asociada a la proteína hsc70. Recientemente, la auxilina, un componente periférico de las vesículas revestidas, ha sido identificado como un regulador de la ATPasa/hsc70 (Prasard et al, 1994). Los complejos AP2 no se liberan de las

vesículas revestidas durante este proceso, resultados recientes sugieren la necesidad de otros factores citosólicos para su liberación (Hinshaw et al, 1994). Si bien las vesículas de clatrina representan un modelo clásico de vesículas revestidas involucradas en la endocitosis de receptores, poco se conoce acerca del papel de las vesículas no revestidas, entre las que cabe citar a las caveolas, en la endocitosis de los receptores.

Las caveolas, se definieron inicialmente atendiendo tan sólo a sus características estructurales. La membrana plasmática de algunas células de mamíferos presenta invaginaciones no revestidas de clatrina con un diámetro de 40-60 nm y una característica forma de omega (*flask shape*) (Severs et al, 1988; Anderson et al, 1993a, 1993b; Parton et al, 1996). La superficie citoplasmática de estas estructuras está recubierta por múltiples filamentos que se orientan paralelamente o que describen espirales (Montesano et al, 1982; Anderson et al, 1991; Peters et al, 1985; Rothberg et al, 1992) (Figura 11).

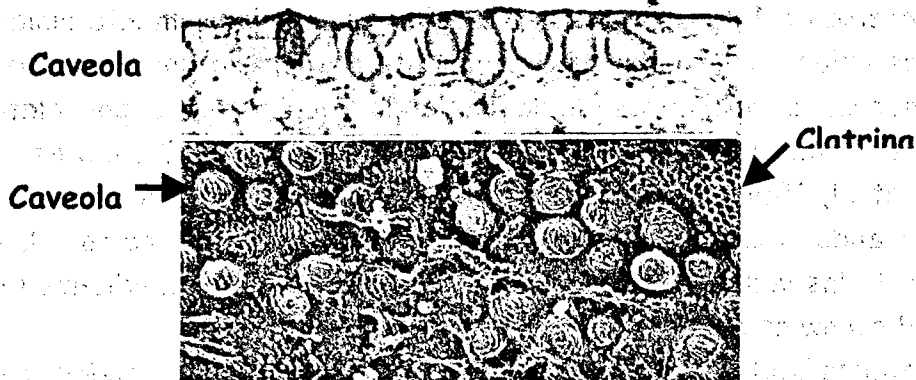


Figura 11. Caveolas en la m.plasmática de fibroblastos humanos. (A) Microscopía electrónica. (B) Deep-etch. Se muestran numerosas caveolas en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. Se puede apreciar como las caveolas difieren en tamaño y estructura de las clatrininas (Roethberg et al, 1992).

La identificación de la caveolina o VIP-21 como principal marcador de estas estructuras, ha facilitado el estudio de este nuevo tipo de vesícula. En los primeros trabajos de Roethberg et al, 1992, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra esta proteína marcando los filamentos que envolvían las caveolas.

La caveolina, a diferencia de otras proteínas de recubrimiento, es una proteína integral de membrana de 178 aminoácidos, con el extremo carboxi-terminal y amino-terminal citosólicos flanqueando una región transmembrana de 33 aminoácidos que podría formar una estructura de bucle (*hairpin loop*) en la propia membrana plasmática (Kurzychalia et al, 1992; Harder et al, 1997; Parton, 1996, Couet et al, 1997) (Figura 12).

Trabajos recientes han puesto de manifiesto la existencia de tres tipos de caveolina (caveolina-1, caveolina-2 y caveolina-3), con una gran similitud estructural y funcional pero con propiedades y distribución tisular específica (Roethberg et al, 1992; Scherer et al, 1996; Way et al, 1995) Mientras la caveolina-2 presenta una distribución muy similar a la caveolina-1, la caveolina-3, originalmente M-caveolina (Way et al, 1995), se distribuye específicamente en músculo y puede llegar a reemplazar a la caveolina-1 como principal proteína de las caveolas en células diferenciadas de músculo (Way et al, 1995, Tang et al, 1996).

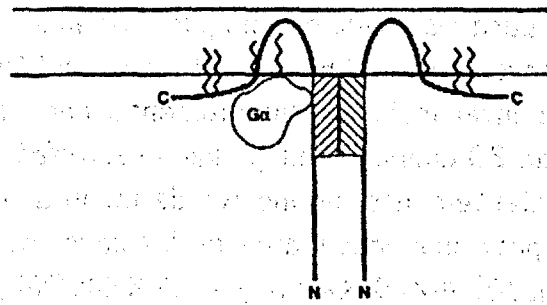


Figura 12. Representación esquemática de la caveolina. El diagrama resume la topología de la caveolina. Se indican los sitios de palmitoilación en el dominio carboxi-terminal de la caveolina-1. La subunidad Ga interacciona con una región de la caveolina proxima a la membrana. Esta región también contiene información para la formación de homooligómeros. En el esquema se muestra un dímero de caveolina (Couet et al, 1997).

Por su especial composición lipídica, se consideran a las caveolas como un tipo concreto de *rafts*, microdominios de la membrana enriquecidos en glicosfingolípidos y colesterol que se asocian con proteínas específicas excluyendo otras (Simon et al, 1997; Harder et al, 1997; Kurzychalia et al, 1999). La formación de estos *rafts* se debe a la fuerza mecánica derivada de la

interacción lípido-lípido. Se los considera como plataformas de concentración de moléculas de señalización o de moléculas con un mismo destino en la célula. La primera evidencia de la existencia de los *rafts*, se ha basado en estudios biofísicos y en el uso de métodos de extracción con detergentes no-iónicos como el Tritón X-100 o el CHAPS. Usando esta técnica, algunos lípidos y proteínas como la caveolina, se encuentran en una fracción de baja densidad que puede ser aislada por centrifugación en gradientes de sacarosa (Sargiacomo et al, 1993; Kurzchalia et al, 1992). Estudios recientes sugieren, sin embargo, que estos métodos pueden conducir a resultados artefactuales (Harder et al, 1997; Kurzchalia et al, 1995; Parton et al, 1996), por lo que actualmente se usan habitualmente medios libres de detergentes en el aislamiento de caveolas.

Son muchas las proteínas implicadas en señalización intracelular asociadas a caveolas. Entre ellas se encuentran la familia de las quinasas Src, las sintasas de óxido nítrico, los receptores EGF-R, PDGF-R, la fosfolipasa C γ , la protein quinasa C, Ras y la subunidad G α de las proteínas G (Ritter et al, 1995; Ying et al, 1992) sugiriendo para las caveolas, un papel de procesamiento e integración de la información proveniente del medio extracelular (Anderson et al, 1993b).

La caveolina, puede interaccionar directamente con estas proteínas vía una región conservada de 20 aminoácidos (*caveolin scaffolding*). Couet et al, 1997, han identificado recientemente, un motivo de unión a caveolina presente en la mayor parte de las proteínas localizadas en las caveolas. Este dominio de unión (*caveolin binding motif*: $\Phi X \Phi XXXX \Phi$ y $\Phi XXXX \Phi XX \Phi$, siendo, Φ un residuo aromático) está presente en muchas subunidades α y en los dominios quinasa de distintas clases de protein quinasas.

Experimentos *in vitro*, sugieren que las distintas caveolinas presentan interacciones funcionales específicas con la subunidad α de las proteínas G, subunidad con actividad GTPasa, modulando el ciclo GTP/GDP propio de dicha subunidad (Tang et al, 1996, Scherer et al, 1996, Li et al, 1995). Polipéptidos derivados de la caveolina-1 inhiben la disociación del GDP de la subunidad α manteniendo inactiva la proteína G (Li et al, 1995); por el contrario, aquellos que derivan de la caveolina-2 estimulan la actividad GTPasa de la subunidad α de la proteína G $_0$ (Scherer et al, 1996). Regiones análogas de la caveolina-3 suprimen o estimulan dicha actividad dependiendo de la concentración del péptido (Tang et al, 1996).

La función de las caveolas sigue siendo un tema en discusión. Están implicadas en la internalización de moléculas pequeñas en un proceso llamado *potocitosis*. Las caveolas, por sus características lipídicas, son el lugar preferido de

localización de las proteínas ancoradas a la membrana plasmática vía glicosilfosfatidilinositol (*GPI-proteins*). Algunas de estas proteínas actúan como vehículos de captura de pequeñas moléculas y iones a nivel de las caveolas, conduciéndolos al interior celular vía transportadores o canales embebidos en la membrana (Anderson et al, 1992, 1993a). Este es el caso del folato. La liberación al citoplasma de folato por un transportador específico, está mediada por un ciclo de internalización vía caveolas (Smart et al, 1995).

La gran abundancia de caveolas en el endotelio vascular, sugiere su participación en procesos de transcitosis (Schnitzer et al, 1993). Algunos receptores de la superficie de las células endoteliales, participan en la transferencia de macromoléculas desde el lumen vascular a espacios subendoteliales vía caveolas. (Simionescu et al, 1972)

El papel de las caveolas en procesos de internalización de receptores es, quizá, el más controvertido ya que clásicamente la endocitosis por vesículas de clatrina se ha considerado la principal vía. Sin embargo, se han descrito procesos de endocitosis independientes de clatrina para una gran variedad de células y para distintos tipos de moléculas: sacarosa, ferritina (Oliver, 1982; Van Deurs and Nicausen, 1982), ricino (Van Deurs et al, 1990), concavalina-A (Hansen et al, 1991), toxinas (Montesano et al, 1982; Tran et al, 1987), lipoproteínas de baja densidad (Mommaas-Kienhuis et al, 1985), virus (Kartenbeck et al, 1989) proteínas-GPI (Keller et al, 1992; Bamezai et al, 1992). Aunque no está claro el tipo de vesícula no revestida que participa en todos estos procesos, todo parece involucrar a las caveolas.

Estudios recientes, han considerado el papel de las caveolas en la internalización de receptores acoplados a proteína G. Roettger et al, 1995, han descrito dos rutas de internalización para el receptor de colecistoquinina, que implicarían vesículas recubiertas de clatrina y vesículas no revestidas (*smooth vesicles*) que podrían ser caveolas. Estos autores hipotetizan que la internalización mediada por clatrina representaría la ruta de endocitosis clásica mientras que las vesículas no revestidas podrían representar reservorios para una posterior y rápida resensibilización dada la proximidad de estas vesículas a la membrana plasmática. También existe controversia acerca del tipo de vesícula que conduce a la internalización de los receptores β -adrenérgicos y los muscarínicos. Mientras Raposo et al, 1989, muestran evidencias de una internalización del receptor β_2 -adrenérgico en células A431, vía vesículas no revestidas, von Zastrow and Kobilka en sus trabajos de 1992 demuestran la internalización del receptor mediante vesículas de clatrina en células 293. Del mismo modo, para el receptor m2-muscarínico Feron et al ,

1997, demostraron una traslocación del receptor a caveolas tras la estimulación con agonistas mediante técnicas de centrifugación isopícnica e inmunoprecipitación usando radioligandos mientras que el receptor m1-muscarínico internalizaría vía vesículas de clatrina (Tolbert and Lameh, 1996). Estos datos sugieren que el tipo de vesícula implicado en la internalización del receptor puede depender del tipo celular estudiado.

1. 2. 3. 2. Endocitosis del receptor A_1 de adenosina.

Los fenómenos involucrados en la desensibilización del receptor A_1 de adenosina han sólo parcialmente estudiados. Por ejemplo, se conoce con cierto detalle que la fosforilación juega un papel importante en este proceso. El receptor A_1 de adenosina contiene en el tercer y segundo bucle intracelular, sitios consenso de fosforilación para PKA y PKC (Olah et al, 1992; Stiles, 1992). En células DDT₁MF-2, la incubación con el agonista R-PIA induce fosforilación del receptor rápidamente (5 min de incubación). Los aminoácidos que aparecen fosforilados tras la incubación con R-PIA, son residuos de Ser y Tyr (Saura et al, 1998), mientras que la fosforilación del receptor en estas células vía la estimulación de la PKA y la PKC resulta en Thr y Ser. Tanto la exposición crónica a R-PIA como la activación de PKA y PKC conduce a la clusterización y desensibilización funcional del receptor, por lo que es probable que sea la fosforilación en Ser la más importante para que tengan lugar estos fenómenos.

También tras 5 min de exposición a R-PIA, es evidente en células DDT₁MF-2 una pérdida de funcionalidad del receptor (disminución de la acumulación de inositoles fosfato IP₃ y movilización de Ca⁺⁺ intracelular) (Ciruela et al, 1997). A tiempos más prolongados (15-45 min) los receptores se agregan y acumulan en zonas específicas de la membrana (*clusters*) y se observa una reducción tiempo dependiente del número de centros de unión del agonista en la membrana plasmática, siendo a las 48 horas de preincubación con R-PIA del 50 % (Ciruela et al, 1997). Un fenómeno parecido se observa en células granulares de cerebelo (Hettinger-Smith et al, 1996; Vendite et al, 1998). Si la exposición al agonista se prolonga durante horas, se produce una disminución dependiente del tiempo y de la dosis, de los centros de unión (~ 45 %) y del estado de alta afinidad (30 %), además del desacoplamiento funcional del receptor A_1 y de la adenilato ciclasa en estas células del cerebro (Hettinger-Smith et al, 1996; Vendite et al, 1998). Si estas células se incuban durante 24-48 h con el

agonista, no se observan cambios en la concentración de mRNA del receptor, pero sí un aumento de receptores A_1 en la fracción microsomal, lo que explicaría que la *down-regulation* del receptor tendría lugar a nivel postranscripcional, posiblemente vía lisosomal (Vendite et al, 1998).

Aunque se haya estudiado el proceso de desensibilización, se desconoce en gran medida si este proceso conlleva la internalización del receptor y las vías de endocitosis implicadas. Parece que la internalización por agonistas de gran parte de los receptores acoplados a proteínas G , tales como β_2 -AR (von Zastrow and Kabilka, 1992), el 5-HT $_2a$ de serotonina (Berry et al, 1996), el NK1 de neuroquinina (Böhm et al, 1997), los D_1 y D_2 de dopamina (Ozaki et al, 1994), el de hormona luteinizante (Hoxie et al, 1993) y el de trombina (Ghinea et al, 1992) tiene lugar vía vesículas de clatrina. El receptor A_1 de adenosina, se ha encontrado en vesículas de clatrina de cerebro de rata, tanto constitutivamente como tras el tratamiento *in vivo* con agonistas R-PIA (Gonzalez-Calero et al, 1992; Ruiz et al, 1996) pero se desconoce si las vesículas de clatrina están implicadas en la endocitosis del receptor A_1 de manera generalizada.

1.3. ADENOSINA DESAMINASA.

Tal como se ha descrito en el apartado 1.1 la célula dispone de diversos mecanismos que permiten regular la concentración de adenosina extracelular que actúa como hormona capaz de activar a los receptores de adenosina. Prácticamente todas las células disponen de transportadores específicos para nucleósidos que permiten la eliminación o la aparición de adenosina en el medio extracelular. Además se ha descrito, la presencia en la superficie celular de ectoenzimas capaces de producir adenosina extracelular a partir de nucleótidos purínicos. La acción de estos enzimas está contrarestrada por la existencia de ADA unida a la membrana plasmática, ecto-ADA, con capacidad para degradar la adenosina extracelular (Franco et al, 1990; Aran et al, 1991). El papel de la ecto-ADA en la homeostasis de la adenosina extracelular es un hecho aceptado en la actualidad. Sin embargo, estudios recientes otorgan a la ecto-ADA además un papel extraenzimático como coestimulador celular al interaccionar con otras proteínas de membrana como los receptores A_1 de adenosina o el CD26 alcanzando este enzima la categoría de proteína multifuncional de membrana (revisado por Franco et al, 1997, 1998)

1.3.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CINÉTICA DE LA ADENOSINA DESAMINASA.

La adenosina desaminasa está codificada por un único gen localizado en el cromosoma 20 (Tischfield et al, 1974). La clonación y posterior secuenciación de la ADA humana (Daddona et al, 1984; Wiginton et al, 1986) demostró que este enzima está formado por 362 aminoácidos con un peso molecular de 41 kDa. La secuenciación de la ADA murina (Yeung et al, 1985) y la de *E. Coli* (Chang et al, 1991) mostró una identidad del 33% y una homología del 50 % entre el enzima de estos mamíferos y la ADA bacteriana.

A finales de la década de los 60 se puso de manifiesto la existencia de diferentes patrones electroforéticos para la ADA (Spencer et al, 1968). Hirschhorn et al, 1994, concluyeron que la sustitución de una Asn por un Asp era la responsable del polimorfismo genético de la ADA, siendo este cambio coherente con la menor migración electroforética de las bandas correspondientes al llamado fenotipo 2 (Asp) respecto al fenotipo 1 (Asn).

Wilson et al, 1991, mediante difracción de rayos X han conseguido determinar la estructura cristalina de la ADA murina unida a un inhibidor (6(R)-hidroxil-1,6-dihidropurina; HDPR) con una estructura química similar al intermediario tetrahédrico. Estos estudios han permitido conocer la situación exacta del centro activo y de los residuos aminoacídicos que intervienen en la reacción (Asp^{295} , Asp^{296} , y Glu^{217}) y además han evidenciado que un ión Zn^{2+} interviene como cofactor en la reacción (Wilson et al, 1991; Wilson and Quioco, 1993; Mohamedali et al, 1996; Sideraki et al, 1996)

La estructura secundaria de la ADA está formado por un dominio de hélice α /barril β con ocho láminas paralelas β centrales y ocho hélices α adicionales (Wilson et al, 1991). Esto representa una estructura terciaria muy compacta, caracterizada por la presencia de aminoácidos hidrofílicos en su superficie pero también en su parte más externa hay dominios pequeños de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 13)

La ADA (EC.3.5.4.4) es un enzima del metabolismo purínico que cataliza la reacción de desaminación irreversible de la adenosina o 2'-desoxiadenosina en inosina y 2'-desoxiinosina respectivamente (Conway and Cooke, 1939). La ADA es un enzima de comportamiento michaeliano, con una K_m para la adenosina de 10-100 μM según el organismo y algo ligeramente menor para la 2'-desoxiadenosina (Van Der Weyden and Kelley, 1976; Fonoll et al, 1982; Martínez et al, 1984; Lupidi et al, 1992). El mecanismo de reacción, es una adición-eliminación con dos etapas (Figura 14).

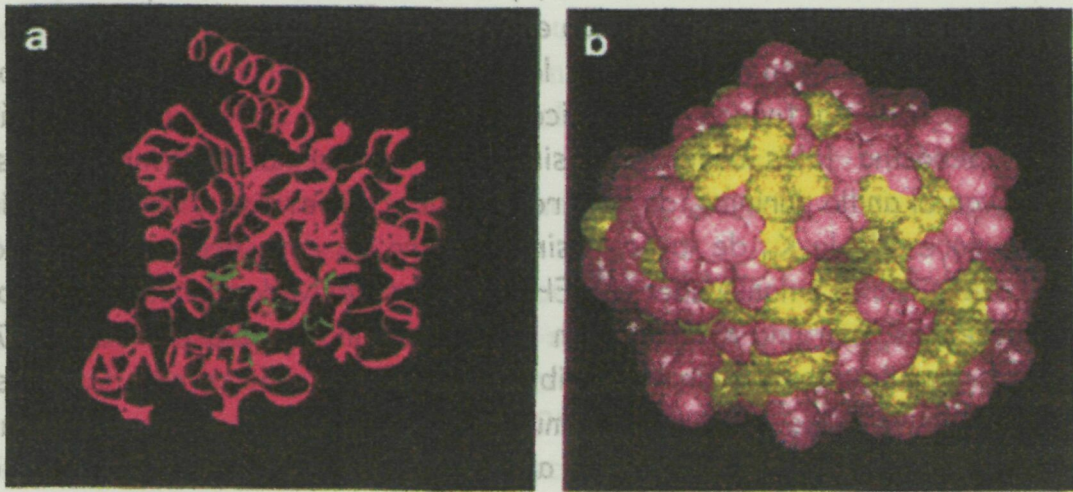


Figura 13. Estructura tridimensional de la adenosina desaminasa. (a) Estructura tridimensional de la ADA según Wilson et al. (1991) En verde se muestra el centro activo donde se une la adenosina. (b). Estructura glomerular de la ADA. Los aminoácidos hidrofílicos se representan en color morado mientras que los hidrofóbicos en amarillo.

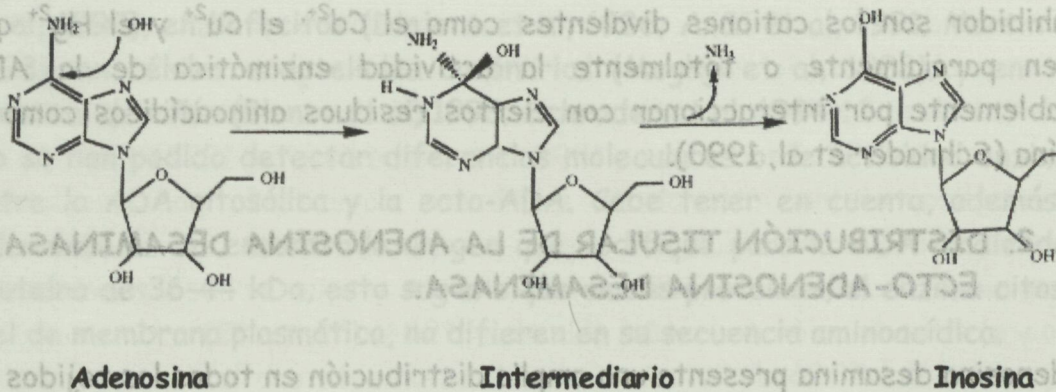


Figura 14. Reacción catalizada por la adenosina desaminasa

La primera consiste en el ataque de una molécula de agua sobre la adenosina, formándose un intermediario tetrahédrico, que en una segunda etapa por eliminación de amoníaco, rinde la inosina (Frick et al, 1986; Wolfense and Frick, 1986). La etapa limitante de la reacción, es la formación del intermediario

tetraédrico (Kurz et al, 1985, 1987) y más concretamente la protonación del nitrógeno 1 de la adenosina. (Orozco et al, 1989).

En la caracterización cinética de la ADA, se han utilizado tres tipos de inhibidores de la actividad enzimática. El primer tipo son inhibidores análogos a la adenosina tales como la inosina y la nebularina. Son inhibidores que conservan el anillo purínico, de tipo reversible, competitivo y con una K_i similar a los valores de la K_m de la adenosina. Dentro de este grupo el inhibidor 9-(eritro-2-hidroxi-3-nonil) adenina (EHNA) y sus derivados hidroxilados son los más potentes, con una K_i del orden de nanomolar (Vargeese et al, 1997). El segundo tipo lo constituyen los inhibidores análogos del estado de transición tales como la coformicina (Nakamura et al, 1974) y su análogo la 2'-desoxicoformicina (DCF) (Padua et al, 1990; Marrone et al, 1996) y el 6(R)-hidroxil-1, 6-dihidropurina ribonucleósido (HDPR). Son los inhibidores de la ADA más potentes que existen, siendo de carácter irreversible. Los valores descritos para la constante de inhibición son inferiores a nanomolar (Showalter et al, 1983). En el caso de la 2'-desoxicoformicina, se ha comprobado que la unión de la molécula al enzima da lugar a un complejo reversible, con una constante de disociación de 100 μM , pero un cambio conformacional posterior, provoca la unión irreversible del inhibidor al enzima.). Finalmente el tercer tipo de inhibidor son los cationes divalentes como el Cd^{2+} , el Cu^{2+} y el Hg^{2+} que inhiben parcialmente o totalmente la actividad enzimática de la ADA probablemente por interactuar con ciertos residuos aminoácidos como la cisteína (Schrader et al, 1990).

1. 3. 2. DISTRIBUCIÓN TISULAR DE LA ADENOSINA DESAMINASA. ECTO-ADENOSINA DESAMINASA.

La adenosina desamina presenta una amplia distribución en todos los tejidos de las especies estudiadas hasta el momento. La mayor actividad específica se detecta en el tracto gastrointestinal (duodeno, estómago y yeyuno) y en los órganos linfáticos (timo y bazo). Por el contrario, la tiroides, el riñón, el corazón, el hígado y el músculo esquelético, poseen concentraciones mucho menores de este enzima (Van der Weyden and Kelley, 1976; Trotta et al, 1979).

Estudios realizados por Spencer et al, 1968 y posteriormente por Carson et al, 1987, demostraron la existencia de diferentes formas de este enzima; así, en los órganos con mayor actividad enzimática aparecía una forma de bajo peso molecular (40kDa) mientras que, en los otros tejidos, aparecía una forma de

elevado peso molecular (~200kDa). La existencia de la ADA de elevado peso molecular quedó explicada al descubrirse una proteína con capacidad para unir ADA de bajo peso molecular que se denominó proteína de unión de ADA (ADA binding protein, ADAbp) (Hirschhorn et al, 1975; Van der Weyden and Kelley, 1976). Esta proteína, cuya funcionalidad no se conocía en el momento de su descubrimiento, es un dímero cuyas subunidades tienen un peso molecular de 106 kDa (Daddona and Kelley, 1978).

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

Durante mucho tiempo se ha considerado que la adenosina desaminasa es un enzima exclusivamente citosólico; sin embargo, a finales de los años ochenta se sugirió la existencia de una forma del enzima extracelular, Adenosina desaminasa unida a la membrana plasmática (ecto-ADA). Numerosos estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos han demostrado la existencia de ADA de superficie o ecto-ADA en eritrocitos (Franco et al, 1990), en plaquetas (Franco et al, 1990), en linfocitos (Dinjens et al, 1986; Aran et al, 1991; Martin et al, 1993), en células endoteliales coronarias (Meghji et al, 1988); y en túbulo proximal de riñón (Blanco et al, 1993; Schrader et al, 1994).

No se han podido detectar diferencias moleculares o de actividad enzimática entre la ADA citosólica y la ecto-ADA. Cabe tener en cuenta, además, que solamente se ha encontrado un gen que codifique para la ADA rindiendo una proteína de 36-44 kDa, esto sugiere que ambas proteínas, el enzima citosólico y el de membrana plasmática, no difieren en su secuencia aminoacídica.

En el presente capítulo se describirá la estructura y función de la ADA unida a la membrana plasmática, así como la interacción de esta enzima con los receptores de adenosina.

1. 3. 3. PROTEÍNAS DE UNIÓN DE LA ECTO-ADA: CD26 Y RECEPTORES A₁ DE ADENOSINA.

La adenosina desaminasa no presenta dominios transmembrana, es decir, no se trata de una proteína integral de membrana; sin embargo, tal como hemos descrito en el apartado anterior, se ha demostrado su presencia en la membrana plasmática de una gran variedad de células. Este hecho permitió formular la hipótesis que la ecto-ADA está anclada a la superficie celular a

través de una proteína de unión que actuaría como receptor o vehículo de anclaje.

El CD26/ADAbp/DPP IV es un dímero de peso molecular del orden de 200 kDa

(Daddona and Kelley, 1978) y con distinto grado de glicosilación según la

especie considerada (Schrader et al, 1979). Distintos grupos de investigación

han clonado los cDNA que codifican para el CD26 humano, de rata y de ratón

(Marguet et al, 1992; Tanaka et al, 1992; Yaron and Naidner, 1993). El CD26,

es una sialoglicoproteína integral de membrana constituida por un dominio

intracelular de 6 aminoácidos, una región transmembrana de 22 aminoácidos y

un dominio extracelular de 738 aminoácidos en el que se localiza el centro

activo y el sitio de unión de la ADA (Fleisher, 1994) (Figura 13).

La capacidad del CD26 de interaccionar directamente con la ADA se puso de

manifiesto en linfocitos T mediante técnicas de coimmunoprecipitación y

citometría de flujo usando anticuerpos específicos (Kameoka et al, 1993;

Morrison et al, 1993; De Meester et al, 1994). La actividad catalítica ya sea

del CD26 ya de la ADA, no son esenciales para la interacción alostérica de

ambas proteínas (Dong et al, 1996; Jeanfavre et al, 1996).

Si bien el CD26 se expresa de forma constitutiva en un gran número de células

(epiteliales del intestino, túbulo proximal de riñón, placenta y cerebro) (Trotta

1982; Stein et al, 1989) en linfocitos T su expresión está altamente regulada.

En linfocitos T de sangre periférica su expresión es baja pero ésta aumenta

tras la activación de las células T (Fleisher, 1987). La activación de los

linfocitos, también producea un incremento en la expresión de la ecto-ADA juntamente con otros marcadores linfocitarios (Martin et al, 1993).

1. 3. 3. 2. El CD26 como molécula de adhesión.

La gran cantidad de nombres con los que se designa al CD26 (DPP IV, glicoproteína de la biomatriz del hígado de rata, THAM, Tp103 y proteína de unión de la ADA) refleja las variadas funciones del CD26 y las múltiples interacciones en las que participa. Como se ha descrito en el apartado anterior, el CD26 tiene capacidad para unir ADA, pero ésta no es la única molécula con la que puede interaccionar. Torimoto et al, 1991 y Fleisher en 1995 demostraron la interacción del CD26 con el CD45. Puesto que el CD45 es una tirosin fosfatasa y un regulador positivo de la señalización vía TCR, esta asociación entre el CD26 y el CD45 puede ser responsable de los efectos estimuladores del CD26 implicándolo en la regulación de la señal de transducción en células T. (Fleischer et al, 1994). Hay evidencias (Bernard et al, 1994; Braday-Kalnay and Tonks, 1995) que implican el CD45 en el control de la adhesión celular a dos niveles:

- En señales que regulan la adhesión dependiente de integrinas.
- En su unión a integrinas que pueden modular la adhesión.

No se conoce con exactitud el ligando que, unido al CD45, puede actuar favoreciendo la adhesión, pero puesto que varios autores han descrito la asociación CD45/CD26 no se puede descartar que este último tenga un papel importante en la adhesión.

Por otro lado, el CD26 puede interaccionar con moléculas de la matriz extracelular (Neubert et al, 1995; Ohkubo et al, 1994) sugiriendo que puede ejercer una función adicional como molécula de adhesión celular (Löhster et al, 1995). En este sentido se ha demostrado que el CD26 interviene en la unión de los linfocitos T helper a colágeno (Chen et al, 1994; Fleisher, 1994) y tiene un papel relevante en la interacción de los hepatocitos con la matriz extracelular. El CD26, en este caso, se une a la fibronectina favoreciendo la interacción entre los hepatocitos y la matriz extracelular (Piazza et al, 1989). La metástasis, es un proceso por el cual células cancerígenas establecen nuevas colonias tumorales en órganos secundarios. Parece ser que el CD26, mediante su actividad exopeptidasa, está implicado en procesos de metástasi favoreciendo la degradación de la matriz extracelular, principalmente fibrinógeno y colágeno y, por tanto, permitiendo la migración de las células cancerígenas a otros tejidos. (Chen et al, 1994). El CD26, también participa en

la interacción de células cancerígenas de mama y próstata con el endotelio del pulmón, facilitando la metástasis y, por tanto, la propagación del tumor. Johnson et al, 1993, propusieron que la capacidad del CD26 de unir fibronectina estaría implicada en este proceso ya que en las líneas tumorales de mama (R3230AC-MET) y próstata (RPC-2) que estudiaron encontraron numerosas células decoradas con gran cantidad de fibronectina en relación con las células no tumorales. Estos autores formularon la hipótesis que la fibronectina, se uniría a la superficie de las células tumorales vía moléculas de integrinas y que la expresión de fibronectina estaría up-regulada en las células tumorales. Estudios preliminares parecían además indicar que la fibronectina de la superficie celular podría servir como un intermediario de adhesión entre las integrinas de las células tumorales y el CD26 del endotelio capilar (Johnson et al, 1993).

El uso de anticuerpos anti-dipeptidil peptidasa IV bloquea la adhesión de células tumorales al endotelio, inhibiendo la metástasis al pulmón (Chen et al, 1994). Esto parece indicar que el centro de reconocimiento de la fibronectina está relacionado con el centro activo del CD26. Sin embargo, a este respecto existe cierta controversia. El CD26 presenta tres regiones distintas en su dominio extracelular: una región altamente glicosilada, una región rica en cisteínas y la región carboxi-terminal donde se localiza la actividad exopeptidasa. Se ha demostrado que anticuerpos dirigidos contra la región rica en cisteínas inhiben la unión del CD26 al colágeno (Löhster et al, 1995) mientras que la inhibición de la actividad catalítica, no afecta a dicha unión. Por otro lado, el sitio de unión entre la fibronectina de hepatocitos y el CD26 es distinto del centro catalítico, ya que inhibidores de la actividad DPP IV intensifican la interacción, probablemente porque causan un cambio conformacional del enzima que la favorece (Piazza et al, 1989). El CD26 parece pues ser una molécula multifuncional en la que sus diferentes dominios están involucrados en funciones distintas.

1.3.3.3. El receptor A₁ de adenosina como proteína de anclaje de la ecto-ADA. Implicación de la ecto-ADA como modulador del receptor A₁ de adenosina.

El receptor A₁ de adenosina es una proteína de membrana que se encuentra en la superficie de las células que expresan este sistema de purinas. Este receptor está acoplado a la vía de señalización G-proteína dependiente que activa la fosfolipasa C-β y la proteína quinasa C. La activación de este receptor resulta en la liberación de diacilglicerol e inositol trifosfato, lo que conduce a la activación de la proteína quinasa C y la liberación de calcio intracelular. Este sistema de señalización está implicado en una amplia gama de procesos fisiológicos, como la regulación de la actividad enzimática, la liberación de neurotransmisores y la modulación de la actividad eléctrica de las células.

Si bien existen evidencias contundentes que la ecto-ADA se une al CD26 (ver subapartado 1.3.3.1) en algunos tejidos de determinadas especies se ha demostrado que ambas proteínas no codistribuyen. Mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha demostrado que no colocalizan en corteza de riñón humano, de ratón, de rata y de conejo (Schrader et al, 1994; Dinjens et al, 1989). Asimismo, en cerebro de conejo, el CD26 se concentra en neuronas mientras que la ADA, se concentra en células de la oligodendroglía y células endoteliales de vasos sanguíneos (Schrader et al, 1987).

Por otro lado, el CD26 murino es incapaz de unir ADA de su propia especie y de cualquier otra (Dinjens et al, 1989) al igual que la ADA murina es incapaz de interaccionar con el CD26 de diferentes especies. Así, el CD26 de conejo puede unirse a la ADA de conejo, a la humana o a la de mono, pero no puede unir ADA murina o de cobaya (Schrader et al, 1990). Puesto que la ecto-ADA muestra un papel relevante en el metabolismo extracelular, estos resultados sugerían que quizá podían existir otras proteínas, distintas del CD26, con capacidad de unir y anclar ADA en la membrana plasmática.

Experimentos recientes realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el receptor A_1 de adenosina puede actuar como proteína de anclaje de la ADA (Ciruela et al, 1996, Saura et al, 1996, Saura et al, 1998). La inmunoprecipitación del receptor A_1 de adenosina de extractos solubles de membranas de corteza cerebral de cerdo o de células de musculatura lisa de hamster DDT₁MF-2, coinmunoprecipita una banda de 44 kDa que corresponde a la ADA. Además, extractos solubles de receptor A_1 de células DDT₁-MF2 quedan retenidos en un 60% en una columna de afinidad de ADA-Sepharosa. Estos datos indicaban que al menos en estos dos sistemas ambas moléculas eran capaces de interaccionar.

Ciruela et al, 1997, mediante técnicas de inmunocitoquímica, demostraron que en células DDT₁-MF2 se observa una baja colocalización entre el CD26 y la ADA de la superficie celular, mientras que la colocalización entre el receptor A_1 de adenosina y la ADA es alta, siendo por tanto el receptor A_1 de adenosina el que actúa como vehículo de anclaje de la ADA de la superficie de estas células.

La interacción entre el receptor A_1 y la ecto-ADA es independiente de la actividad catalítica del enzima pero depende de la conformación que éste adopte. Mientras la inhibición de la ADA con Hg^{2+} no impide coinmunoprecipitarla con el receptor A_1 de adenosina, la inhibición con R-DCF imposibilita la coinmunoprecipitación de los complejos A_1 /ADA (Saura et al, 1996). Ello es debido a que la R-DCF estabiliza a la enzima en su estado de

transición (Marrone et al, 1996), adoptando una conformación crítica para interactuar con el receptor A_1 de adenosina. Un hecho importante puesto de manifiesto por nuestro grupo de investigación es que la ADA al interactuar con el receptor A_1 modula su funcionalidad. Así en membranas de corteza cerebral de cerdo y en células DDT₁-MF2 la aparición del estado de alta afinidad por agonistas del receptor sólo ocurre en presencia de ADA. En membranas exhaustivamente lavadas a las que no se adiciona ADA el receptor muestra únicamente el estado de baja afinidad (Ciruela et al, 1996, Saura et al, 1996). Estos resultados sugieren que la ADA potencia la interacción entre el receptor A_1 y su correspondiente proteína G incrementando la afinidad por los ligandos. En células DDT₁-MF2 la activación del receptor A_1 de adenosina con agonistas además de producir una disminución del AMPc conduce a aumentos en los niveles de IP₃ y de Ca²⁺ (Gerwins et al, 1990; Gerwins and Fredholm, 1992; Dickenson and Hill, 1993) los cuales se incrementan en más de cuatro veces por adición de ADA en el medio. El efecto estimulador de la ADA en la producción de segundos mensajeros es independiente de su actividad catalítica; ya que una inhibición con Hg²⁺ no repercute en la acción del enzima (Ciruela et al, 1997). La unión de la ADA al receptor A_1 acelera el proceso de desensibilización inducido por agonistas. La ADA potencia la clusterización del receptor en la membrana y la fosforilación e internalización del receptor en células DDT₁MF-2 (Saura et al, 1998).

Estos datos han permitido elaborar un modelo de interacción en el que, en ausencia de ADA, la unión de la adenosina o análogos al receptor A_1 de adenosina, estaría cinéticamente desfavorecida así como también lo estaría la transducción de la señal. En estas condiciones no se produciría una máxima señalización ni una rápida desensibilización del receptor aunque la concentración de adenosina en el medio fuese extremadamente alta (por ejemplo tras una hipoxia) por falta del enzima que la degrada. Si hay ADA en el medio la interacción con el receptor conduciría a un cambio conformacional del receptor que haría más efectiva la unión del ligando, la unión con la proteína G_i y por tanto una efectiva transducción de la señal para concentraciones de adenosina más moderadas por la presencia de ADA en el medio extracelular. (revisión Franco et al, 1997)

1.4. RECEPTORES DE DOPAMINA.

Los receptores de dopamina (DR) se encuentran distribuidos en el sistema nervioso central y periférico. Existen cinco subtipos de DR denominados DR₁ a DR₅.