

УДК 577.354

## КОЛОКАЛИЗАЦИЯ АДЕНОЗИНОВОГО РЕЦЕПТОРА $A_{2B}$ И АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В МЕМБРАНАХ ПРИСТЕНОЧНЫХ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА\*

© 2015 Р.М. Арин\*\*, А.И. Валледжо, Ю. Руеда,  
О. Фреснедо, Б. Очоа

*Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
University of the Basque Country UPV/EHU, Sarriena s/n,  
48940 Leioa, Spain; fax: +34(946)015-662,  
E-mail: rosamaria.arin@ehu.es*

Поступила в редакцию 24.07.14  
После доработки 19.09.14

Аденозиновый рецептор  $A_{2B}$  ( $A_{2B}R$ ) опосредует биологические ответы на внеклеточный аденозин в самых разнообразных типах клеток. Аденозиндезаминаза (ADA) – фермент, разрушающий аденозин и способный связываться с аденозиновым рецептором на внешней поверхности клеток. Аденозин регулирует секрецию ионов хлора пристеночными клетками слизистой оболочки желудка. Тесные функциональные связи между  $A_{2B}R$  и ADA были обнаружены в клетках иммунной системы, но пока неизвестно, происходят ли взаимодействия этих двух белков в клетках желудочно-кишечного тракта. Цель настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, коэкспрессируются ли  $A_{2B}R$  и ADA на поверхности плазматических мембран секретирующих кислоту пристеночных клеток слизистой оболочки желудка. Клетки слизистой оболочки были изолированы после очистки элютриационным центрифугированием, а мембранная фракция была получена центрифугированием в градиенте сахарозы. Экспрессию мРНК  $A_{2B}R$  анализировали методом ОТ-ПЦР. Поверхностную экспрессию  $A_{2B}R$  и ADA изучали методами вестерн-блоттинга, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Было установлено, что  $A_{2B}R$  и ADA экспрессируются в мембранах пристеночных клеток желудка, и показана высокая степень их колокализации, что особенно заметно в местах контакта поверхностей пристеночных клеток. Данные, полученные методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии, свидетельствуют о тесной ассоциации между  $A_{2B}R$  и ADA, что, возможно, непосредственно связано с секреторной функцией железистых клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** аденозиновый рецептор, аденозиндезаминаза, пуриновая сигнализация, клеточные мембраны, пристеночные клетки слизистой оболочки желудка.

Аденозин – регуляторный метаболит, пуриновый нуклеозид, регулирующий различные физиологические процессы. Большое количество аденозина продуцируется внутри клеток и секретируется наружу при повреждении тканей в ответ на метаболический стресс, гипоксию или ишемию [1]. Клеточными посредниками аденозина являются специфические аденозиновые рецепторы, ассоциированные с G-белками [2].

Принятые сокращения:  $A_{2B}R$  – аденозиновый рецептор типа  $A_{2B}$ ; ADA – аденозиндезаминаза; эктоADA – ADA, связанная с клеточной поверхностью; FITC – флуоресцеинизоцианат; п.н. – пары нуклеотидов.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-219, 28.12.2014.

\*\* Адресат для корреспонденции.

Среди известных четырех типов аденозиновых рецепторов ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  и  $A_3$ ) рецептор  $A_{2B}$  ( $A_{2B}R$ ) изучен менее всех и остается наиболее загадочным, поскольку обладает низким сродством к аденозину ( $EC_{50} \sim 24$  мкМ) [2], и до сих пор обнаружено лишь несколько его специфических агонистов. В последнее время рецепторы этого типа привлекли большое внимание, поскольку была обнаружена их связь с процессами воспаления и канцерогенеза, а также обсуждалась возможность их использования в качестве мишеней для терапии с привлечением различных фармакологических препаратов [3]. Особенно примечательным является то, что при воспалительной ишемии внеклеточный уровень аденозина увеличивается до уровня, достаточного для активации  $A_{2B}R$ , а также то, что наблюдается транскрипционная регуляция  $A_{2B}R$  фак-

торами, задействованными в воспалительной гипоксии [4], что предполагает возможное участие A<sub>2B</sub>R в процессе контроля воспаления при гипоксии тканей [5].

Аденозиндезаминаза (ADA) — фермент, присутствующий во внутри- и внеклеточных компартментах, который катализирует необратимое дезаминирование аденозина и превращение его в инозин. Внеклеточная ADA обладает способностью взаимодействовать с клеточной поверхностью и является секретрируемым экзоферментом [6, 7]. Связанная с клеточной поверхностью ADA (эктоADA) выполняет разнообразные функции и, помимо деградации аденозина, способна выступать в качестве дополнительного стимулятора в некоторых регуляторных процессах, а также функционировать как коммуникационный мостик между клетками [8]. В качестве «якорных» молекул для ADA выступают аденозиновые рецепторы A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> и A<sub>2B</sub>, а также широко распространенный белок CD26 (дипептидилпептидаза 4) [9, 10]. С другой стороны, эктоADA принимает участие в модуляции переноса сигнала путем взаимодействия с аденозиновыми рецепторами A<sub>1</sub> и A<sub>2B</sub> [9]. Некоторыми авторами были описаны тесные взаимоотношения между ADA и A<sub>2B</sub>R, особенно когда эти два белка были одновременно экспрессированы на поверхности клеток [11, 12].

Ранее было установлено, что аденозин и его аналоги стимулировали секрецию кислоты изолированными железами и пристеночными клетками слизистой оболочки желудка кролика [13–15]. Секреция желудочной кислоты (0,5%-ные HCl, KCl, NaCl) пристеночными клетками зависит от выделения ионов Cl<sup>-</sup> некоторыми типами клеток слизистой желудка; показано, что функция переноса хлорида регулируется A<sub>2B</sub>R в других типах клеток. Известно, что в эпителии кишечника человека связывание аденозина с A<sub>2B</sub>R приводит к активации электрогенного выброса ионов Cl<sup>-</sup> при воспалении [16]. В клетках эпителия толстого кишечника A<sub>2B</sub>R экспрессированы в люминальных и базолатеральных мембранах, где они стимулируют секрецию хлоридов [17]. Кроме того, аденозин может воздействовать на A<sub>2B</sub>R апикальных мембран, чтобы напрямую стимулировать секрецию хлорида через посредство особого белка (cystic fibrosis conductance regulator protein) в клетках мышей линии mIMCD-K2, являющихся моделью почечных медуллярных собирающих канальцев [18].

Наше исследование ставило своей целью установить, экспрессируется ли A<sub>2B</sub>R на мембранах пристеночных секретрирующих кислоту клетках слизистой оболочки желудка и колокалізується ли он с ADA.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Изоляция пристеночных клеток из слизистой оболочки кишечника кролика.** В работе были использованы Новозеландские кролики (самцы и самки) весом 2,5–4 кг. Содержание животных и все экспериментальные процедуры выполняли в соответствии с Испанскими (RD 1201/2005) и Европейскими (2003/65/CE и 2007/526/CE) правилами работы с лабораторными животными. Кроликов усыпляли введением анестетика пентобарбитала. Слизистую оболочку желудка получали, как описано в работе Берглинд и Обринк [19]: желудки перфузировали буфером PBS, рассекали и соскабливали слизистую. Клетки слизистой оболочки желудка изолировали по методу Фрейккланд с соавт. [20] в модификации Ейдз с соавт. [13]. Пристеночные клетки очищали путем элютриационного центрифугирования, как описано ранее [21]. Жизнеспособность клеток определяли с использованием трипанового синего (90–95% живых клеток в препаратах). Функциональную способность клеток определяли по измерению уровня секреции соляной кислоты в ответ на стимуляцию 10<sup>-3</sup>–10<sup>-7</sup> М гистамином (данные не представлены).

**Получение лишенных аденозина плазматических мембран** проводили по методу Муаллема с соавт. [22] с некоторыми модификациями. Клетки (60 × 10<sup>6</sup> на 1 мл) гомогенизировали в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7,4), содержащем 250 мМ сахарозу, 0,5 мМ ЭДТА, 0,54 мМ дитиотреитол, 5 мкг/мл леупептина, 15,7 мкг/мл бензамидина, в гомогенизаторе Поттера. Супернатант (700 мл) наслаивали на 47%-ную сахарозу и центрифугировали в бакет-ротаторе при 100 000 g в течение 45 мин при 4°. Фракцию плазматических мембран собирали с границы раздела фаз, ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4) и центрифугировали при 120 000 g в течение 20 мин при 4°. Затем мембраны инкубировали с ADA (2 ед/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре для разрушения эндогенного аденозина. Препарат мембран хранили в том же буфере при –80°.

**Иммуноокрашивание: проточная цитометрия и конфокальная микроскопия.** Процедуру окрашивания клеток проводили, как описано в работе Мирабет с соавт. [11]. Нативные пристеночные клетки (4 × 10<sup>6</sup> в буфере PBS, pH 7,4) обрабатывали 2%-ным параформальдегидом (w/v) в присутствии 60 мМ сахарозы в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали буфером PBS, содержащим 20 мМ глицин, а затем блокировали 1%-ным БСА. Иммуноокрашивание проводили с использованием кроличьих антител против A<sub>2B</sub>R человека [11] или против ADA человека [23]. В качестве вторичных анти-

тел использовали FITC-конъюгированные антикроличы IgG («Boehringer Mannheim», Германия). Первичные антитела были получены и любезно предоставлены проф. Р. Франко из Барселонского университета (Испания). Проточный цитометрический анализ выполняли с помощью проточного цитометра EPICS Profile («Coulter Corporation», США). Отбор клеточных субпопуляций проводили путем оценки значений фронтального (FS) и латерального (SS) светорассеяния. Сортировку клеток осуществляли с помощью оборудования EPICS Profile.

При конфокальной микроскопии клетки окрашивали так же, как и при проточной цитометрии, но для визуализации ADA были использованы TRITC-конъюгированные вторичные антитела («Boehringer Mannheim», Германия). Клетки были заключены в среду Immuno-Fluore и сканированы с использованием конфокального сканирующего лазерного микроскопа Leica TCS 4D, соединенного с инвертированным микроскопом Leitz DMIRBE («Leica Lasertechnik GmbH», Германия). Анализ колокализации выполняли с использованием программы Multi Color version 2.0 («Leica Lasertechnik GmbH», Германия).

**Анализ мРНК методом ОТ-ПЦР.** Тотальную РНК экстрагировали из  $1 \times 10^7$  клеток с использованием Trizol Reagent («Invitrogen», Испания), кДНК получали путем обратной транскрипции (SuperScript II RT, «Invitrogen», Испания) в соответствии с инструкцией производителя. Обнаружение мРНК  $A_{2B}R$ , кодируемой геном *ADORA2B*, выполняли путем детекции конечных продуктов ПЦР с использованием двух пар праймеров: 5'-CGTTCCATGCCATCAACTG/TTGACATCCGTCTGGCAGAGA-3' и 5'-TCGTCAACCCATCTGTGTATG/TCCTAGGTTGGGCATGTG-GAA-3' (AY630339) в концентрации 0,6 мкМ. ПЦР проводили за 40 циклов амплификации ( $94^\circ - 30$  с,  $60^\circ - 1$  мин,  $72^\circ - 1$  мин; далее инкубация  $72^\circ - 10$  мин) с использованием рекомбинантной HotStar Taq ДНК-полимеразы («Qiagen», Германия), предварительно активированной в течение 1 мин при  $95^\circ$ . Продукты амплификации (202 и 251 п.н.) разделяли путем электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле и окрашивали бромистым этидием.

**Вестерн-блоттинг и количественное определение белков.** Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [24] с использованием БСА в качестве стандарта. Ds-Na-электрофорез в 7,5%-ном ПААГ и иммуноблоттинг  $A_{2B}R$  и ADA были проведены на изолированных плазматических мембранах пристеночных клеток желудка, как описано в работе Херрера с соавт. [12], с использованием 20–25 мкг белка на лунку. Для иденти-

фикации белков были использованы упомянутые выше специфические первичные антитела и конъюгаты вторичных антител. Гладкомышечные клетки хомяка линии DDT<sub>1</sub> MF-2 (DDT1) и коммерческий очищенный препарат ADA («ICN Biomedical Inc.», США) были использованы в качестве положительного контроля для выявления  $A_{2B}R$  и ADA соответственно.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что аденозин играет важную роль в работе желудочно-кишечного тракта. Он подавляет секрецию желудочной кислоты у морских свинок [25], собак [26] и крыс [27]. В желудке мышей аденозин оказывал двойственное действие на выброс соматостатина: в высокой концентрации он стимулировал секрецию этого гормона при посредстве рецепторов  $A_{2A}$ , а в низкой – ингибировал, действуя через аденозиновые рецепторы  $A_1$ . Можно считать, что существует несколько механизмов модуляции работы желудочно-кишечного тракта под действием аденозина [28].

Проведенные ранее фармакологические испытания показали также, что аденозин и некоторые его аналоги могут стимулировать секрецию кислоты железами и пристеночными клетками слизистой оболочки желудка кролика [13–15]. В качестве первого шага для выяснения роли  $A_{2B}R$  в регуляции секреции кислоты пристеночными клетками желудка мы изучали экспрессию  $A_{2B}R$  в плазматических мембранах пристеночных клеток слизистой оболочки желудка кролика.

С целью выяснить, экспрессируют ли эти клетки  $A_{2B}R$ , кодируемый геном *ADORA2B*, мы воспользовались методом ОТ-ПЦР и проанализировали четыре различных препарата пристеночных клеток с использованием двух различных наборов праймеров. На рис. 1, а (см. цветную вклейку) продемонстрировано, что все четыре препарата были положительными по крайней мере по одному из двух продуктов амплификации гена *ADORA2B* (фрагменты 202 и 251 п.н., см. раздел «Методы исследования»), хотя в препарате 3 уровень амплификации низкий. Такая разница могла быть обусловлена особым функциональным состоянием слизистой оболочки желез.

Для подтверждения предположения о локализации  $A_{2B}R$  в плазматических мембранах клеток мы провели его тестирование методом вестерн-блоттинга во фракции цитоплазматических мембран пристеночных клеток желудка кролика. Как следует из рис. 1, б, иммунореактивный по-

липептид (45 кДа) присутствовал во всех четырех исследуемых препаратах мембран. В качестве положительного контроля использовались гладкомышечные клетки DDT1. В литературе имеются некоторые разногласия по поводу молекулярной массы A<sub>2B</sub>R, по данным ряда авторов она составляет 34,8, 36 или 50 кДа [29–31]. С другой стороны, слабое окрашивание A<sub>2B</sub>R может быть связано с тем, что использовались антитела, специфичные для A<sub>2B</sub>R человека, а не кролика, и их распознавание могло быть только частичным, либо с тем, что в покоящихся пристеночных клетках не весь A<sub>2B</sub>R локализован в мембране [17].

Как было установлено ранее, A<sub>2B</sub>R является одним из якорных белков для ADA [9, 10], деактивирующей аденозин путем его превращения в инозин. Некоторые авторы сообщали о наличии тесной функциональной взаимосвязи между этими двумя белками; эктоADA может взаимодействовать с A<sub>2B</sub>R, а затем оба белка экспрессируются на клеточной поверхности [9, 11, 12]. Методом вестерн-блоттинга показано, что фермент ADA был представлен в препаратах изолированных цитоплазматических мембран пристеночных клеток желудка кролика (рис. 2, а; см. цветную вклейку). Наблюдаемый молекулярный вес (40 кДа) согласуется с литературными данными [32, 33]. Никаких других вторичных иммунореактивных полос не было выявлено.

Присутствие A<sub>2B</sub>R и ADA в цитоплазматических мембранах непроницаемых пристеночных клеток анализировали методом конфокальной микроскопии (рис. 2, б). В изученных нами клеточных препаратах слизистой желудка можно было различить клетки двух типов: пристеночные, несущие на своей поверхности A<sub>2B</sub>R (зеленый цвет) и ADA (красный цвет), и зимогенные (chief) клетки, не демонстрирующие значительных поверхностных флуоресцентных сигналов ни от A<sub>2B</sub>R, ни от ADA. Внутриклеточные сигналы обусловлены, по-видимому, спонтанной пермеабиллизацией этих клеток. Примечательно, что уровень экспрессии A<sub>2B</sub>R и ADA был наиболее высоким в области межклеточных контактов как между пристеночными клетками, так и между пристеночными и зимогенными клетками. Совмещение обоих сигналов («merge», желтый цвет) показало, что колокализация A<sub>2B</sub>R и ADA наблюдается на поверхности пристеночных клеток, тогда как зимогенные клетки экспрессировали только ADA. Цитофлуорограмма, представленная на четвертой панели рис. 2, б («colocalization»), показывает, что области колокации ADA и A<sub>2B</sub>R соответствуют точкам наибольшей интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о тесном соседстве этих двух белков.

Ранее было высказано предположение, что ADA может модулировать связывание A<sub>2B</sub>R-лиганда в других типах клеток. Как и в пристеночных клетках желудка, уровень экспрессии ADA и степень колокации ADA и A<sub>2B</sub>R выше в области межклеточных контактов во многих типах клеток [10, 12]. Предполагаемое участие ADA в модуляции клеточной адгезии в свободном иммунном синапсе, возможно, свидетельствует о ее функционировании в качестве мостика между A<sub>2B</sub>R и другими белками плазматических мембран [10]. В соответствии с данными Пачеко с соавт. [9], ADA, связанная с A<sub>2B</sub>R на поверхности дендритных клеток, может взаимодействовать с белком CD26 на поверхности Т-клеток и стимулировать активацию и пролиферацию этих Т-клеток.

Проточный цитометрический анализ отображает различия в размерах и морфологии, наблюдаемые методом трансмиссионной микроскопии между клетками разных типов, присутствующими в суспензии клеток слизистой оболочки желудка (рис. 3, а, б; см. цветную вклейку). Пристеночные клетки больше по размеру [34, 35] и по внешнему виду более гранулированные [36], чем другие клетки эпителия желудка, что, возможно, обусловлено наличием у них большого количества микроворсинок и присутствием тубуловезикул, что является одной из основных характеристик этих клеток [37–39]. Зимогенные клетки меньше по размеру и негранулированные.

В полученных клеточных препаратах мы обнаружили две субпопуляции клеток. По размеру клеток и степени васкуляризации цитоплазмы субпопуляция R1 содержала пристеночные клетки, тогда как субпопуляция R2 состояла из малых пристеночных и зимогенных клеток. Распределение ADA и A<sub>2B</sub>R в иммуноокрашенных субпопуляциях клеток R1 и R2 представлено на рис. 3, в. На нижней панели показано распределение аутофлуоресценции этих клеток. Высокий уровень аутофлуоресценции клеток R1 является характерной чертой пристеночных клеток и обусловлен содержанием в них большого количества митохондрий [36, 38]. Однако зимогенные клетки не демонстрируют высоких уровней аутофлуоресценции [40], следовательно, эти данные подтверждают, что разделение клеток было сделано в основном в соответствии с типом клеток. При проведении цитометрического анализа с использованием только вторичных антител (none) для оценки флуоресценции при неспецифическом связывании было показано, что интенсивность эмиссии флуоресценции составляла 4,5% для иммуноокрашенных клеток R1 и 39,4% – для R2 (данные не предс-

тавлены). Эти данные были использованы для количественного расчета специфического связывания первичных антител с клеточной поверхностью. Было установлено, что A<sub>2B</sub>R экспрессировался у 75% клеток R1 и 50% клеток R2, а ADA — у 35% клеток R1 и только у 5,5% клеток R2.

Итак, мы показали, что покоящиеся пристеночные клетки слизистой оболочки желудка экспрессируют A<sub>2B</sub>R и ADA. Содержание потенциально функциональных A<sub>2B</sub>R и ADA, ассоциированных с плазматическими мембранами изолированных пристеночных клеток, достигает максимума в областях межклеточных контактов, где эти белки локализованы в наибольшей степени. Было бы интересно провести даль-

нейшие исследования для выяснения функциональной значимости такого соседства этих двух белков, особенно с точки зрения важности A<sub>2B</sub>R в физиологическом процессе секреции кислоты в желудке.

Авторы глубоко признательны всем сотрудникам лаборатории д-ра Рафаэля Франко и д-ра Кармен Луис (факультет биохимии и молекулярной биологии Барселонского университета) за помощь в эксперименте и консультации, а также д-ру Юоландо Чико, д-ру Патриции Аспихета и д-ру Розауре Наварро (факультет физиологии Университета Страны Басков) за техническую помощь.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Van, L.A., and Eltzhig, H.K. (2007) Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **7**, 1437–1447.
2. Fredholm, B.B., IJzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., and Linden, J. (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacol. Rev.*, **53**, 527–552.
3. Thimm, D., Schiedel, A.C., Sherbiny, F.F., Hinz, S., Hochheiser, K., Bertarelli, D.C., Maass, A., and Muller, C.E. (2013) Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A(2B) receptor, *Biochemistry*, **52**, 726–740.
4. Kong, T., Westerman, K.A., Faigle, M., Eltzhig, H.K., and Colgan, S.P. (2006) HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia, *FASEB J.*, **20**, 2242–2250.
5. Aherne, C.M., Kewley, E.M., and Eltzhig, H.K. (2011) The resurgence of A2B adenosine receptor signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1329–1339.
6. Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., and Blanco, J. (1998) Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes, *Immunol. Rev.*, **161**, 27–42.
7. Franco, R., Casado, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E.I., and Lluís, C. (1997) Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme, *Prog. Neurobiol.*, **52**, 283–294.
8. Gines, S., Marino, M., Mallol, J., Canela, E.I., Morimoto, C., Callebaut, C., Hovanessian, A., Casado, V., Lluís, C., and Franco, R. (2002) Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction, *Biochem. J.*, **361**, 203–209.
9. Pacheco, R., Martinez-Navio, J.M., Lejeune, M., Climent, N., Oliva, H., Gatell, J.M., Gallart, T., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (2005) CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9583–9588.
10. Gracia, E., Farre, D., Cortes, A., Ferrer-Costa, C., Orozco, M., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E.I., McCormick, P.J., Franco, R., Fanelli, F., and Casado, V. (2013) The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors, *FASEB J.*, **27**, 1048–1061.
11. Mirabet, M., Herrera, C., Cordero, O.J., Mallol, J., Lluís, C., and Franco, R. (1999) Expression of A2B adenosine receptors in human lymphocytes: their role in T cell activation, *J. Cell Sci.*, **112**, 491–502.
12. Herrera, C., Morimoto, C., Blanco, J., Mallol, J., Arenzana, F., Lluís, C., and Franco, R. (2001) Comodulation of CXCR4 and CD26 in human lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **276**, 19532–19539.
13. Ainz, L.F., Salgado, C., Gandarias, J.M., Gomez, R., Vallejo, A., and Gil-Rodrigo, C.E. (1993) P1(A2/Ra)-purinoceptors may mediate the stimulatory effect of adenosine and adenosine analogs on acid formation in isolated rabbit parietal cells, *Pharmacol. Res.*, **27**, 319–334.
14. Ainz, L.F., Gil-Rodrigo, C.E., Gomez, R., Malillos, M., Requejo, D., and Gandarias, J.M. (1989) Effects of various physiologic adenine derivatives on the secretion of acid in isolated gastric glands in rabbits, *Rev. Esp. Fisiol.*, **45**, 281–286.
15. Gil-Rodrigo, C.E., Galdiz, B., Gandarias, J.M., Gomez, R., and Ainz, L.F. (1990) Characterization of the effects of adenosine, adenosine 5'-triphosphate and related purines on acid secretion in isolated rabbit gastric glands, *Pharmacol. Res.*, **22**, 103–113.
16. Colgan, S.P., Fennimore, B., and Ehrentraut, S.F. (2013) Adenosine and gastrointestinal inflammation, *J. Mol. Med. (Berlin)*, **91**, 157–164.
17. Wang, L., Kolachala, V., Walia, B., Balasubramanian, S., Hall, R.A., Merlin, D., and Sitaraman, S.V. (2004) Agonist-induced polarized trafficking and surface expression of the adenosine 2b receptor in intestinal epithelial cells: role of SNARE proteins, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **287**, 1100–1107.
18. Rajagopal, M., and Pao, A.C. (2010) Adenosine activates a2b receptors and enhances chloride secretion in kidney inner medullary collecting duct cells, *Hypertension*, **55**, 1123–1128.
19. Berglindh, T., and Obrink, K.J. (1976) A method for preparing isolated glands from the rabbit gastric mucosa, *Acta Physiol. Scand.*, **96**, 150–159.
20. Fryklund, J., Wallmark, B., Larsson, H., and Helander, H.F. (1984) Effect of omeprazole on gastric secretion in H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and in pepsinogen-rich cell fractions from rabbit gastric mucosa, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 273–280.
21. Arin, R.M., Rueda, Y., Casis, O., Gallego, M., Vallejo, A.I., and Ochoa, B. (2014) Basolateral expression of

- GRP94 in parietal cells of gastric mucosa, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 8–15.
22. Muallem, S., Burnham, C., Blissard, D., Berglinth, T., and Sachs, G. (1985) Electrolyte transport across the basolateral membrane of the parietal cells, *J. Biol. Chem.*, **260**, 6641–6653.
  23. Aran, J.M., Colomer, D., Matutes, E., Vives-Corrans, J.L., and Franco, R. (1991) Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunohistochemical localization using light and electron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 1001–1008.
  24. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
  25. Heldsinger, A.A., Vinik, A.I., and Fox, I.H. (1986) Inhibition of guinea-pig oxyntic cell function by adenosine and prostaglandins, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 351–356.
  26. Gerber, J.G., Nies, A.S., and Payne, N.A. (1985) Adenosine receptors on canine parietal cells modulate gastric acid secretion to histamine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **233**, 623–627.
  27. Yip, L., and Kwok, Y.N. (2004) Role of adenosine A<sub>2A</sub> receptor in the regulation of gastric somatostatin release, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 804–815.
  28. Yang, G.K., Chen, J.F., Kieffer, T.J., and Kwok, Y.N. (2009) Regulation of somatostatin release by adenosine in the mouse stomach, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **329**, 729–737.
  29. Tan-Allen, K.Y., Sun, X.C., and Bonanno, J.A. (2005) Characterization of adenosine receptors in bovine corneal endothelium, *Exp. Eye Res.*, **80**, 687–696.
  30. Olanrewaju, H.A., Qin, W., Feoktistov, I., Scemama, J.L., and Mustafa, S.J. (2000) Adenosine A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> receptors in cultured human and porcine coronary artery endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, 650–656.
  31. Linden, J., Thai, T., Figler, H., Jin, X., and Robeva, A.S. (1999) Characterization of human A<sub>2B</sub> adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells, *Mol. Pharmacol.*, **56**, 705–713.
  32. Richard, E., Alam, S.M., Arredondo-Vega, F.X., Patel, D.D., and Hershfield, M.S. (2002) Clustered charged amino acids of human adenosine deaminase comprise a functional epitope for binding the adenosine deaminase complexing protein CD26/dipeptidyl peptidase IV, *J. Biol. Chem.*, **277**, 19720–19726.
  33. Beraudi, A., Traversa, U., Villani, L., Sekino, Y., Nagy, J.I., and Poli, A. (2003) Distribution and expression of A<sub>1</sub> adenosine receptors, adenosine deaminase and adenosine deaminase-binding protein (CD26) in goldfish brain, *Neurochem. Int.*, **42**, 455–464.
  34. Sakai, H., Okada, Y., Morii, M., and Takeguchi, N. (1989) Anion and cation channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cells, *Pflugers Arch.*, **414**, 185–192.
  35. Karam, S.M. (2010) A focus on parietal cells as a renewing cell population, *World J. Gastroenterol.*, **16**, 538–546.
  36. Chew, C.S. (1994) Parietal cell culture: new models and directions, *Annu. Rev. Physiol.*, **56**, 445–461.
  37. Miller, M.L., Andringa, A., Zavros, Y., Bradford, E.M., and Shull, G.E. (2010) Volume density, distribution, and ultrastructure of secretory and basolateral membranes and mitochondria predict parietal cell secretory (dys)function, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 394198.
  38. Chew, C.S., Chen, X., Parente, J.A., Jr, Tarrer, S., Okamoto, C., and Qin, H.Y. (2002) Lasp-1 binds to non-muscle F-actin *in vitro* and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly *in vivo*, *J. Cell Sci.*, **115**, 4787–4799.
  39. Lapierre, L.A., Avant, K.M., Caldwell, C.M., Ham, A.J., Hill, S., Williams, J.A., Smolka, A.J., and Goldenring, J.R. (2007) Characterization of immunisolated human gastric parietal cells tubulovesicles: identification of regulators of apical recycling, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **292**, 1249–1262.
  40. Geibel, J., Abraham, R., Modlin, I., and Sachs, G. (1995) Gastrin-stimulated changes in Ca<sup>2+</sup> concentration in parietal cells depends on adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels, *Gastroenterology*, **109**, 1060–1067.

**THE A2B ADENOSINE RECEPTOR  
COLOCALIZES WITH ADENOSINE DEAMINASE  
IN RESTING PARIETAL CELLS FROM GASTRIC MUCOSA**

**R. M. Arin\*, A. I. Vallejo, Y. Rueda, O. Fresnedo, B. Ochoa**

*Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry,  
University of the Basque Country UPV/EHU, Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain;  
fax: +34(946)015-662, E-mail: rosamaria.arin@ehu.es*

Received July 24, 2014

Revision received September 19, 2014

The A2B adenosine receptor (A2BR) mediates biological responses to extracellular adenosine in a wide variety of cell types. Adenosine deaminase (ADA) can degrade adenosine and bind extracellularly to adenosine receptors. Adenosine modulates chloride secretion in gastric glands and gastric mucosa parietal cells. A close functional link between surface A2BR and ADA has been found on cells of the immune system but whether this occurs in the gastrointestinal tract is unknown. The goal of this study was to know whether A2BR and ADA are coexpressed at the plasma membrane of the acid-secreting gastric mucosa parietal cells. We used isolated gastric parietal cells after purification by centrifugal elutriation. The membrane fraction was obtained by sucrose gradient centrifugation. A2BR mRNA expression was analyzed by RT-PCR. The surface expression of A2BR and ADA proteins was evaluated by Western blotting, flow cytometry and confocal microscopy. Our findings demonstrate that A2BR and ADA are expressed in cell membranes isolated from gastric parietal cells. They show a high degree of colocalization that is particularly evident in the surface of contact between parietal cells. Confocal microscopy data together with flow cytometry analysis suggest a tight association between A2BR and ADA that might be specifically linked to glandular secretory function.

*Key words:* adenosine receptor, adenosine deaminase, purine nucleoside signalling, cell membrane, gastric mucosa parietal cell