

흰쥐 대뇌피질에서 A₁ 아데노신 수용체의 탈감작*

연세대학교 원주의과대학 약리학교실 및 기초의학연구소¹, 의과대학 약리학교실²

박 경 선¹ · 양 완 숙¹ · 김 경 환²

=Abstract=

Desensitization of A₁ Adenosine Receptors in Rat Cerebral Cortex

Kyung Sun Park¹, Wan Suk Yang¹ and Kyung Hwan Kim²

Department of Pharmacology and Institute of Basic Medical Sciences¹, Wonju College of Medicine and Department of Pharmacology², College of Medicine

Following the subcutaneous administration of R(-)-N⁶-(2-phenylisopropyl)adenosine(600 nmol/kg/hr) to rats for 1 week using Alzet[®] mini-osmotic pumps, A₁ adenosine receptor functions were determined using [³H]DPCPX binding, [³⁵S]GTP_γS binding, and adenylyl cyclase assays. A₁ adenosine receptor binding and the inhibition of adenylyl cyclase activity by PIA was not altered in cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated rats. However, there was a significant decrease in the A₁ adenosine receptor-mediated stimulation of [³⁵S]GTP_γS binding to cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated rats(22.0% decrease in basal activity; 19.7% decrease in maximal activity). These results suggest that the desensitization of A₁ adenosine receptors following chronic administration involves agonist-induced uncoupling of the receptors from G proteins rather than alteration of A₁ adenosine receptor molecules. It is also suggested that the determination of stimulation of [³⁵S]GTP_γS binding to G proteins is a suitable tool in studying the receptor regulation including desensitization

Key Words: Desensitization, Cerebral cortex, A₁ adenosine receptor, Adenylyl cyclase activity, [³⁵S]GTP_γS binding, [³H]DPCPX binding

Abbreviations: R-PIA, R(-)-N⁶-(2-Phenylisopropyl)adenosine; DPCPX, 8-Cyclopentyl- 1,3-dipropylxanthine; [³⁵S]GTP_γS, [³⁵S]Guanosine-5'-(γ-thio)triphosphate

서 론

Nucleoside의 일종인 아데노신은 세포가 스트레스를 받거나 대사활성이 일어난 경우 세포외로 유리되어 영양공급을 증가시키거나 대사요구량을 감

*본 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 연구되었음.

소시켜 세포의 생리적 항상성을 유지하도록 미세한 조절을 하는데 이러한 작용은 거의 모든 세포에서 일어난다(Collis와 Hourani, 1993). 뇌에서는 ischemia, hypoxia, hypercapnia, hypoglycemia와 같은 metabolic insults 뒤에 아데노신의 농도가 높아진다는 동물실험 결과들이 보고되어 내인성 아데노신이 natural anticonvulsant로 작용하는 것으로 생각되고 있다(Dragunow, 1986과

1988). 사람의 ischemic brain에서도 아데노신 농도가 증가하는 등 동물에서와 유사한 결과를 보여 ischemia, seizure에 따른 cell loss와 neurologic deficit들을 치료하기 위해 아데노신 유도체가 임상적으로 곧 응용될 수 있을 것으로 전망된다.

아데노신의 작용은 대부분 세포막에 존재하는 아데노신 수용체에 의해 일어난다. 아데노신 수용체는 A₁, A₂, A₃로 일반적으로 분류되고 있는데 뇌에서의 신경보호작용은 주로 A₁ 아데노신 수용체를 경유해서 일어난다(Dragunow, 1988). 아데노신 수용체는 G 단백을 경유하여 adenylyl cyclase 외에도, phospholipase A₂, phospholipase C, guanylyl cyclase, potassium channels, calcium channels과 같은 여러 effectors를 매개하여 세포내 신호전달을 일으킨다고 알려져있다(Olsson과 Pearson, 1990).

G 단백질과 연결된 수용체를 흥분시키는 효현제를 장기간 투여하면 일반적으로 수용체의 수(number)가 감소할 뿐 아니라 G 단백질의 수(number)와 분포(distribution)도 변하는 것이 알려져있다(Milligan, 1993). 따라서 A₁ 아데노신 수용체 효현제를 epilepsy, cerebral ischemia를 치료하기 위해 장기간 복용하는 경우에 탈감작은 치료에 중요한 역할을 하게될 것이다. 이제까지 아데노신 수용체의 조절에 관한 연구는 caffeine 또는 theophylline등의 길항제를 장기간 투여하여 실시되었다(Murray, 1982; Fredholm 1982; Green과 Stiles, 1986). 본 연구는 A₁ 아데노신 수용체 효현제인 PIA를 1주간 처치하여 탈감작이 signal transduction에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐 뇌의 아데노신 수용체, G 단백질, 그리고 effector인 adenylyl cyclase에 나타나는 변화를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 시약 및 재료

[³H]DPCPX(120 Ci/mmol), [³⁵S]GTP_γS(1000~1500 Ci/mmol)은 New England Nuclear(Bos-

ton, MA, USA)에서 구입하였고, [³²P]ATP(2 mCi/ml)는 Amersham International plc(ENGLAND)에서 구입하였고, Alzet[®] mini-osmotic pumps는 Alza corp(Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였고, adenosine deaminase(calf intestine)에서 추출; 200 units/mg), GDP, GDP_γS, GTP_γS, bovine serum albumin, dithiothreitol, forskolin은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, R-PIA와 DPCPX는 Research Biochemicals Inc.(Natick, MA, USA)에서 구입하였다. 기타 시약은 analytical grade 제품을 사용하였다.

2) 실험동물

실험동물로는 일주일 이상 본 대학 동물실 환경에 적응시킨 몸무게 200~250 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였고, 동물실은 오전 6시에 불이 들어오고 오후 6시에 불이 나가는 light cycle을 유지하였다.

3) A₁ 아데노신 수용체의 탈감작 유발

A₁ 아데노신 수용체의 desensitization은 Alzet mini-osmotic pumps를 사용하여 PIA를 피하에 600 nmoles/kg/hr의 infusion rate로 투여하여 일으켰다(Parsons와 Stiles, 1987).

4) Crude cerebrocortical membranes의 준비

흰쥐는 circadian rhythm의 가능성을 고려하여 일정시각(오전 10시)에 decapitation으로 희생시켰다(Virus등, 1984). 희생 즉시 whole brain을 적출하여 0.32 M sucrose(9 ml/g tissue)가 든 Potter-Elvehjem type homogenizer에 넣고 homogenization하였다. Crude homogenate를 1,000×g에서 15분 동안 원심분리하였고, 상층액을 20,000×g(18,000 rpm)에서 30분 다시 원심분리하였다. 이때 생긴 상층액은 제거하고 pellet을 1 mM EDTA를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(25°C에서 pH 7.4)로 2회 세척하였고, 최종 pellet을

1 mM EDTA를 함유하는 50 mM Tris-HCl buffer (25°C에서 pH 7.4)로 단백질 농도가 약 5 mg/ml 가 되도록 재부유시켜 -70°C freezer에 보관하였다.

5) Adenylyl cyclase activity의 측정

Adenylyl cyclase activity는 Salomon등(1974)의 방법으로 측정하였다. Reaction mixture의 volume은 100 μ l이었으며, 0.1 mM ATP, 0.1 mM cAMP, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM GTP, 100 mM NaCl, 5 mM creatine phosphate, 25 U/ml creatine phosphokinase, 0.1 mg/ml BSA, 0.5 unit/ml adenosine deaminase, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4)를 함유하였다. 반응은 reaction mixture에 crude membrane fractions(약 5~10 μ g의 세포막 단백질/tube)을 가해 시작하였고 30°C에서 15분간 incubation하였다. 반응이 끝난후 생성된 [³²P]cAMP는 alumina column과 Dowex 50 column을 차례로 사용하여 분리하였으며, [³²P]cAMP에 의한 radioactivity는 Beckman liquid scintillation counter를 사용하여 측정하였다.

6) [³⁵S]GTP _{γ} S binding의 측정

[³⁵S]GTP _{γ} S binding을 측정하기 위한 분석혼합액의 최종용량은 200 μ l로서 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 μ M GDP, 1 mM dithiothreitol, 100 mM NaCl, 0.2 units/ml adenosine deaminase, 0.3 ~ 0.5 nM [³⁵S]GTP _{γ} S(약 50,000 cpm), 그리고 0.1 mg/ml BSA를 포함하였다(Lorenzen등, 1993). 반응은 세포막 fractions(약 2 μ g의 세포막 단백질/tube)을 가하면서 시작하고 30°C에서 45분 동안 반응시켰다. Brandel cell harvester를 사용하여 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂(pH 7.4) 용액으로 미리 적서 둔 glass fiber filters(Whatmann GF/B)에 시료 24 tubes를 동시에 여과시켜 반응을 끝내고, 계속해서 위와 같은 buffer로 5 ml씩 2회 세척하였다. Radioligand의 nonspecific binding은 10 μ M unlabeled GTP _{γ} S를 reaction mixture에

함께 넣어 측정하였다.

7) [³H]DPCPX binding의 측정

[³H]DPCPX saturation binding study를 위한 assay mixture의 최종용량은 1 ml로서 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.5 units/ml adenosine deaminase, 0.1 nM [³H]DPCPX, 그리고 0.5 mg/ml BSA를 포함하였다(Bruns등, 1987). 약 40 μ g/tube의 세포막 fraction을 첨가하면서 반응을 시작하고 30°C에서 90분동안 실시하였다. 이때 2 tubes를 한 조로 하였다. Nonspecific binding은 100 μ M R-PIA를 함께 넣어 결정하였다. Brandel cell harvester를 사용하여 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM MgCl₂로 미리 적서 둔 glass fiber filters(Whatmann GF/B)에 시료 24 tubes를 동시에 여과시켜 반응을 끝내고, 5 ml씩 2회 위와 같은 buffer로 세척하였다. 그리고 다시 filter를 꺼내어 10 ml의 cocktail이 든 scintillation vial에 넣고 30분 동안 세계 shake한 다음 30분간 실온에 방치한 후 Beckman counter로 radioactivity의 양을 측정하였다.

8) 단백질 농도의 측정

단백질 농도는 Bradford의 방법에 따라 측정하였다(Bradford, 1976).

9) 자료 분석

[³H]DPCPX binding은 nonlinear least-square curve fitting program인 LIGAND(Munsen와 Rodbard, 1980)를 사용하였다. [³⁵S]GTP _{γ} S binding data로부터 EC₅₀의 계산은 Prism 2.0 (GraphPad, USA)을 사용하여 분석하였다. 기타 자료의 통계 분석은 unpaired groups에 대한 Student's *t*-test를 사용하고 모든 결과는 mean \pm standard error로 표시하였다.

결 과

수컷 흰쥐를 두 군으로 나누어 한 군(PIA 처치

군)에는 Alzet mini-osmotic pumps를 사용하여 아데노신 수용체 효현제인 PIA를 1주간 처치하여 desensitization을 유발시키고, 다른 한 군은 대조군으로 사용하였다(Parsons와 Stiles, 1987). PIA를 1주일간 처치한 후 두 군의 쥐에서 cerebrocortical membrane을 만들어 3가지 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 탈감작으로 인한 [³H]DPCPX binding의 변화

A₁ 아데노신 수용체에 선택적으로 작용하는 길항제인 [³H]DPCPX를 사용하여 saturation binding studies를 실시하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이 PIA 처치군과 대조군의 K_d(dissociation constant)나 B_{max}(total receptor site)에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

2) 탈감작으로 인한 [³⁵S]GTP_γS binding의 변화

Brain에서 아데노신 수용체에 의한 adenylyl cyclase의 조절에 관한 연구는 다른 조직과는 다르게 signal에 비해 noise가 커서 연구에 어려움이 많았다. 그러나 최근 신호전달의 초기반응을 보다 직접적으로 monitor할 수 있는 방법들이 개발되어 brain에서의 연구가 훨씬 용이해졌다. 본 연구에

Table 1. Characteristics of A₁ adenosine receptor binding in cerebrocortical membranes from PIA-treated and control rats*

Treatment	PIA-treated	Control
K _d (nM)	7.0±0.2	8.1±0.3
B _{max} (fmol/mg protein)	950.0±37.1	987.7±48.5

* The total number of receptor sites(B_{max}) and the dissociation constant(K_d) of [³H]DPCPX binding to A₁ adenosine receptors were determined from the saturation binding experiments using the computer program LIGAND. Data are presented as means± standard errors; n = five rats per group. No significant differences between PIA-treated and control groups were observed.

서는 brain의 cerebral cortex에서 A₁ 아데노신 수용체 효현제에 의해 G_i 단백질이 활성화되는 것을 G_i 단백질과 [³⁵S]GTP_γS의 binding을 측정하여 분석하였다(Lorenzen, 1993).

Fig. 1은 PIA 처치군과 대조군에서 얻은 cerebrocortical membranes의 R-PIA에 의한 [³⁵S]GTP_γS binding의 stimulation을 나타낸 그림으로 R-PIA 처치군에서 통계적으로 유의있게 감소하였다(p<0.05). R-PIA 처치군에서 basal [³⁵S]GTP_γS binding은 약 22.0% 감소되었고, R-PIA에 의한 [³⁵S]GTP_γS binding의 maximal activation은 약 19.7%가 감소하였다. 또한 PIA 처치군의 EC₅₀도 대조군에 비해 2.5배나 유의있게 감소하였다.

Fig. 2는 Mg²⁺의 농도에 따른 [³⁵S]GTP_γS binding의 stimulation 정도를 비교한 것이다. 모든 Mg²⁺의 농도에서 PIA 처치군의 [³⁵S]GTP_γS binding이 감소하였음을 알 수 있었다. 참고로, data는 표시하지 않았지만 아데노신 수용체가 탈감작되었을때, G 단백질과 수용체의 binding 활성화에 미치는 NaCl과 GDP의 역할을 PIA 처치군과

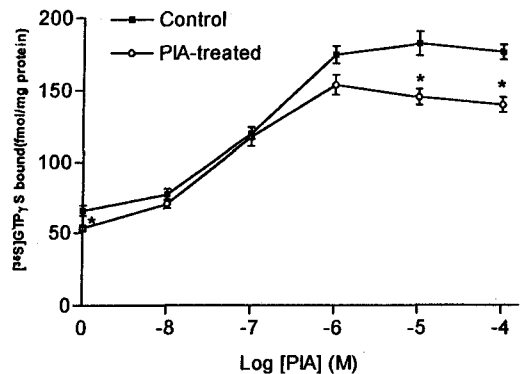


Fig. 1. Concentration-response curves for the stimulation of [³⁵S]GTP_γS bindings by R-PIA in cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated and control rats. Crude membranes were incubated with indicated concentrations of PIA in the assay mixture under the "[³⁵S]GTP_γS binding assay" conditions for 45 min. Data are presented as means± standard errors; n=five rats per group.

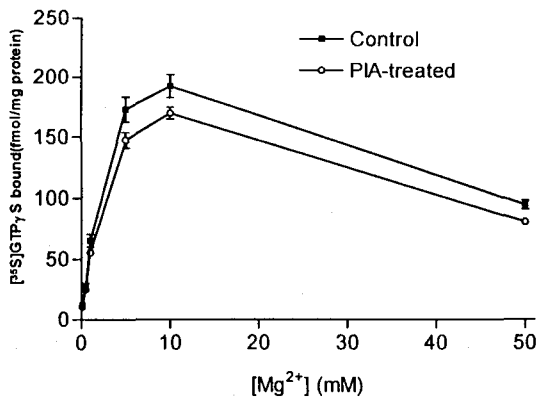


Fig. 2. Effect of magnesium concentration on PIA-stimulated [³⁵S]GTP_γS bindings in cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated and control rats. Crude membranes were incubated with 10⁻⁴M PIA and indicated concentrations of magnesium chloride in the assay mixture under the “[³⁵S]GTP_γS binding assay” conditions for 45 min. Data are presented as means±standard errors; n=five rats per group.

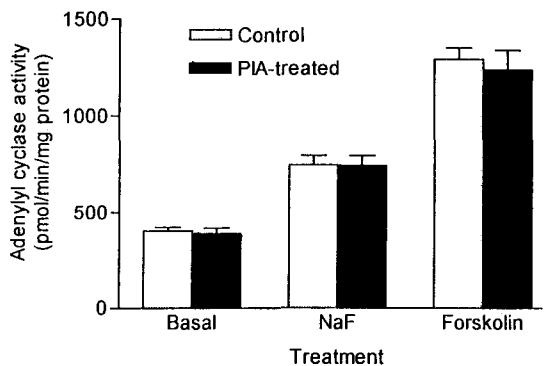


Fig. 3. Stimulation of adenylyl cyclase activity by NaF and forskolin in cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated and control rats. Crude membranes were incubated with 10 mM NaF or 10⁻⁴M forskolin in the assay mixture under the “adenylyl cyclase assay” conditions for 15 min. Data are presented as means±standard errors; n=five rats per group. No significant differences between PIA-treated and control groups were observed.

대조군에서 비교하였으나 뚜렷한 변화가 없었다.

3) 탈감작으로 인한 PIA-inhibited adenylyl cyclase activity의 변화

다음으로 저자들은 A₁ adenosine receptors의 effector인 adenylyl cyclase에 대한 효과를 검색하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 1주간의 PIA처치는 basal adenylyl cyclase activity에는 아무런 변화를 주지 않았다. 탈감작으로 인한 변화를 자세히 characterize하기 위하여 guanine nucleotide binding protein이나 catalytic unit의 기능을 검색하였다. 그러나 1주간의 PIA처치는 NaF나 forskolin에 의한 adenylyl cyclase의 activation에도 아무런 변화를 주지 않는 것으로 나타났다.

Fig. 4는 여러 가지 GTP농도에서 10⁻⁴ M PIA의 존재하에서 adenylyl cyclase activity를 비교한 그림이다. 모든 GTP농도에서 PIA처리군과 대조군의 adenylyl cyclase activity는 10⁻⁷M의 GTP에서 최고의 activity를 나타내는 biphasic

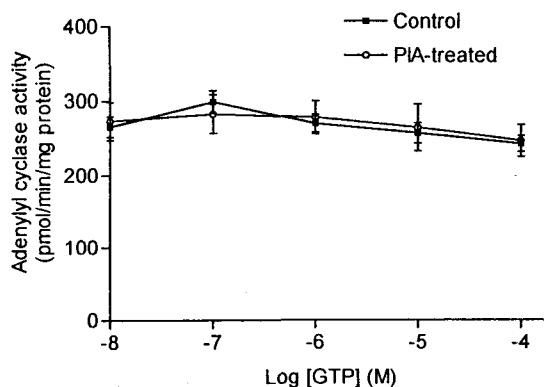


Fig. 4. Effect of GTP concentration on PIA-inhibited adenylyl cyclase activity in cerebrocortical membranes prepared from PIA-treated and control rats. Crude membranes were incubated with 10⁻⁴M PIA and indicated concentrations of GTP in the assay mixture under the “adenylyl cyclase assay” conditions for 15 min. Data are presented as means±standard errors; n=five rats per group. No significant differences between PIA-treated and control groups were observed.

curves를 나타냈으며, 두 groups간에는 통계적으로 유의적인 차이가 없었다.

고 찰

본 연구에서는 1주간 PIA를 처치한 후 흰쥐의 cerebral cortex에 존재하는 A_1 아데노신 수용체에 대한 [3H]DPCPX binding의 변화를 관찰할 수가 없었다. 더욱이, PIA에 의한 adenylyl cyclase activity의 억제정도도 변하지 않았다 (Porter등, 1988). 그러나 본실험에서 사용된 G 단백질에 대한 [^{35}S]GTP $_{\gamma}$ S binding을 측정하였을 때, PIA처리군에서 basal activity와 maximal activity 모두 대조군에 비해 유의있게 감소됨을 알 수 있었다.

이제까지 아데노신 유도체의 뇌에 대한 작용에 관한 연구는 주로 caffeine등과 같은 길항제를 가지고 실시하였다(Jacobson등, 1996; Green과 Stiles, 1986). 특히 Caffeine을 장기간 투여한 후 중추신경계의 A_1 과 A_{2A} 아데노신 수용체의 수나 기능에 미치는 영향에 관한 연구는 여러 실험실에서 여러가지 dose regimens으로 연구되었다. 대부분의 연구에서 A_1 수용체는 up regulation되었으나 A_1 수용체의 mRNA의 levels은 변하지 않았다. 이것은 post-transcriptional mechanism으로 A_1 수용체를 down regulation 시키려는 내인성 효현제의 작용을 길항시켜 나타나는 것으로 생각된다. 이와는 대조적으로 대부분의 A_{2A} 수용체에서는 receptor binding이나 mRNA가 변하지 않았다.

효현제에 의한 아데노신 수용체의 조절에 관한 대부분의 연구들은 흰쥐 지방세포의 adenylyl cyclase의 억제와 연결된 A_1 아데노신 수용체의 하향조절(down-regulation) 실험들을 통해서 이루어졌다(Milligan, 1993). A_1 아데노신 수용체의 하향조절은 N^6 -phenylisopropyladenosine(PIA, 대사가 되지 않는 아데노신 효현제)을 실험동물에 일정기간 지속적으로 주입하거나, 배양한 지방세포에 직접 투여하여 일으켰다. 두 경우 모두 수용

체의 density가 감소하였으며, G_i 단백질의 α subunit인 40~41 kDa polypeptide의 pertussis toxin에 의한 [^{32}P]ADP-ribosylation이 병행해서 감소되었다. 수용체와 G 단백질 모두 하향조절이 일어나는 것으로 보아, 수용체와 G 단백질의 감소가 연관(coupled)되어 일어나는 것으로 생각된다.

Adenylyl cyclase를 억제하는 또 다른 내인성 물질인 prostaglandin E_1 을 지방세포에 지속적으로 처치하면 pertussis toxin-sensitive G 단백질의 α subunit이 PIA 처리시와 유사하게 감소된다. 이와는 대조적으로 nicotinic acid(아직 확실히 규명되지 않은 수용체를 활성화시켜 GTP-dependent manner로 지방세포의 adenylyl cyclase를 억제하는 물질)는 G 단백질의 양을 변화시키지 않았다(McKenzie등, 1991). PIA나 prostaglandin E_1 을 지방세포에 전처치하면, 이 두 물질 뿐만 아니라 nicotinic acid에 대한 세포들의 antilipolytic 반응이 감소한다. 그러나 nicotinic acid 처치 후에는, nicotinic acid에 대한 세포의 antilipolytic 반응은 떨어지나, PIA나 prostaglandin E_1 의 반응은 변하지 않았다(McKenzie등, 1991). 따라서 이러한 PIA나 prostaglandin E_1 에 의한 G_i subtype의 down-regulation은 heterologous desensitization으로 생각되며, 반면에 nicotinic acid 처치의 경우에 G 단백질이 조절되지 않는 receptor desensitization은 homologous 형태로 수용체 수준에서만 일어나는 것 같다. G_i subtype의 down-regulation의 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. Whole animals을 사용한 실험에서는 PIA에 의한 G 단백질의 down-regulation은 mRNAs의 양이 감소하지 않는 것으로 보아, G 단백질 유전자의 expression을 변화시켜 일어나는 것이 아니라 효현제의 처치로 G 단백질의 분해가 촉진되어 일어나는 것 같다(Milligan, 1993).

A_1 아데노신 수용체 효현제인 아데노신은 뇌에서의 신경보호작용이 잘 알려져 있어 cerebral ischemia와 seizure에 따른 cell loss와 neurologic deficit들을 치료하기 위해 조만간 임상적으로 사용될 전망이다(Dragunow, 1986과 1988; Rudol-

phi 등, 1992). 아데노신은 현재 supraventricular arrhythmia에 임상적으로 사용되고 있다. 한편 A₁ 아데노신 수용체 길항제들도 cognitive disorder, sleep apnea, renal diseases, ischemic bradyarrhythmia 등에 앞으로 응용될 전망이다(Collis와 Hourani, 1993). 약물치료라는 관점에서 볼 때 A₁ 아데노신 수용체 효현제를 장기간 투여하게 될 경우 수용체 탈감작현상이 나타나 약물 효과의 감소를 초래하게 된다. 이러한 결과는 아데노신 수용체에만 국한되지 않으며, 모든 수용체 효현제의 장기투여에도 확장 적용될 수 있을 것이다. 나아가 임상적인 측면에서 본 연구의 결과는 아데노신 효현제가 seizures나 ischemia에 장기간 사용되는 경우, 탈감작에 의한 치료효과의 감소를 막을 수 있는 방법을 개발하는데 기여하리라고 생각한다.

결 론

PIA를 1주간 처치하여 흰쥐의 cerebral cortex에 나타나는 A₁ 아데노신 수용체의 탈감작은 수용체 자체에 일어나는 변화에 기인하기보다는, 수용체와 G단백의 uncoupling에 의한 것으로 사료된다. 일반적으로 많이 사용되는 functional assay인 adenylyl cyclase activity를 측정하는 방법으로는 signal에 비해 noise가 비교적 커서 탈감작에 의한 변화를 관찰하기가 힘들었다. 그래서 본 연구에서는 G단백에 대한 [³⁵S]GTP_γS binding을 측정하는 방법을 사용하였는데, 대조군에 비해 PIA처리군은 basal activity가 22.0%, maxiaml activity가 19.7% 감소하였음을 확인하였다. 이 [³⁵S]GTP_γS binding을 측정하는 assays는 탈감작과 같은 수용체의 조절과정을 연구하는 좋은 tool이 될 수 있으리라 생각된다.

감사 말씀

저자들은 curve-fitting computer program인 LIGAND를 사용할 수 있도록 배려해 주신 미국 NIH의 Dr. P.J. Munson과 Dr. D. Rodbard에게

감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Bradford MM: *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, 1976
- Bruns RF, Fergus JH, Badger EW, Bristol JA, Santay LA, Hartman JD, Hay SJ and Huang CC: *Binding of the A₁-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1, 3-dipropylxanthine to rat brain membranes.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 335: 59-63, 1987
- Collis MG and Hourani SMO: *Adenosine receptor subtypes.* *Trends Pharmacol Sci* 14: 360-366, 1993
- Costa T, Lang J, Gless C and Herz A: *Spontaneous association between opioid receptors and GTP-binding regulatory proteins in native membranes: Specific regulation by antagonists and sodium ions.* *Mol Pharmacol* 37: 383-394, 1989
- Dragunow M: *Adenosine: the brain's natural anticonvulsant.* *Trends Pharmacol Sci* 7: 128-130, 1986
- Dragunow M: *Neuroprotective effects of adenosine.* *Trends Pharmacol. Sci* 9: 193-194, 1988
- Fredholm BB: *Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine.* *Acta Physiol Scan* 115: 283-286, 1982
- Gierschik P, Sidiropoulos D and Jakobs KH: *Two distinct G-proteins mediate formyl peptide receptor signal transduction in human leukemia(HL-60) cells.* *J Biol Chem* 264: 21470-21473, 1989
- Green RM and Stiles GL: *Ingestion sensitizes the A₁ adenosine receptor-adenylyl cyclase system in rat cerebral cortex.* *J Clin Invest* 77: 222-227, 1986
- Jacobson KA, von Lubitz DKJE, Daly JW and Fredholm BB: *Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treat-*

- ment. *Trends Pharmacol. Sci* 17: 108-113, 1996
- Lorenzen A, Fuss M, Vogt H and Schwabe U: Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A₁ adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: Stimulation of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio) triphosphate binding. *Mol Pharmacol* 44: 115-123, 1993
- McKenzie FR, Adie EJ and Milligan G: *Biochem. Soc Trans* 19: 81S, 1991
- Milligan G: Agonist regulation of cellular G protein levels and distribution: mechanisms and functional implications. *Trends Pharmacol. Sci* 14: 413-418, 1993
- Munsen PJ and Rodbard D: LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239, 1980
- Murray TF: Up-regulation of rat cortical adenosine receptors following chronic administration of theophylline. *Life Sci* 24: 2083-2092, 1979
- Olsson RA and Pearson JD: Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845, 1990
- Parsons WJ and Stiles GL: Heterologous desensitization of the inhibitory A₁ adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes. Regulation of both N_s and N_i. *J Biol Chem* 262: 841-847, 1987
- Porter NM, Radulovacki M and Green RD: Desensitization of adenosine and dopamine receptors in rat brain after treatment with adenosine analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 244: 218-225, 1988
- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE and Fredholm BB: Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischemia. *Trends Pharmacol Sci* 13: 439-445, 1992
- Salomon Y, Londos C, and Rodbell M: A highly sensitive adenylyl cyclase assays. *Anal Biochem* 58: 541-548, 1974
- Virus RM, Baglajewski T and Radulovacki M: Circadian variation of [³H]N⁶-(L-phenyliso1propyl)adenosine binding in rat brain. *Neurosci Lett* 46: 219-222, 1984
-